# Infektionsversuche im Zusammenhang mit epidemiologischen Untersuchungen zur viralen hämorrhagischen Septikämie (VHS) der Regenbogenforelle (Salmo gairdneri RICHARDSON)

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
MANUEL KONRAD
aus Stuttgart

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0071

# Infektionsversuche im Zusammenhang mit epidemiologischen Untersuchungen zur viralen hämorrhagischen Septikämie (VHS) der Regenbogenforelle (Salmo gairdneri RICHARDSON)

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
MANUEL KONRAD
aus Stuttgart

1986

Tag der mündlichen Prüfung: 7. Februar 1986

| | |
|---|---|
| Dekan: | Prof. Dr. R. Hampp |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. W. Harder |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. O.C. Straub |

Für Martina,
Michael und Malte

Für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes danke ich dem Präsidenten der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen, Herrn Präsident und Professor Dr. G. Wittmann.

Die Arbeit wurde durch die finanzielle Unterstützung des Ministeriums für Ernährung, Landwirtschaft, Umwelt und Forsten, Baden-Württemberg ermöglicht.

Herrn Prof. Dr. W. Harder danke ich für seine Anregungen und die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Herrn Dr. P.-J. Enzmann gilt mein besonderer Dank für die Betreuung, seine wissenschaftliche und persönliche Beratung und sein stetes Interesse während der ganzen Arbeit.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für interessante Diskussionen, Anregungen, die gute Zusammenarbeit sowie das gute Arbeitsklima. Insbesondere danke ich:

Herrn Dr. F. Weiland für seine Geduld, mit der er mich in die Problematik der Histopathologie einarbeitete;

Frau K. Leinenbach, Frau A. Straubinger, Frau Ch. Urban und ganz besonders Frau J. Fabian für die Mithilfe bei der Durchführung der Arbeiten;

den Tierpflegern der Bundesforschungsanstalt für die Pflege der Fische und ihre stetige Hilfsbereitschaft bei der Entnahme der Blutproben;

Herrn R. Straub und Herrn P. Schröter für die Anfertigung der Abbildungen, sowie Frau C. Dicker für die Reinschrift des Manuskripts;

Herrn Dr. H. Wetzlar, Herrn Dr. J. Rapp und Herrn Th. Strubelt für die gute Zusammenarbeit bei den epidemiologischen Untersuchungen.

Meinen Eltern, die mir das Studium und die anschließende Ausbildung ermöglichten, möchte ich an dieser Stelle besonders danken.

"Last not least" möchte ich meiner Frau herzlich danken, die durch ihre Unterstützung und stets währende Geduld sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | EINLEITUNG | 1 |
| | Chemischer Aufbau und Morphologie des VHS-V | 2 |
| | Antigene Eigenschaften und Wirtsspektrum des VHS-V | 3 |
| | Infektion und allgemeine Pathologie | 4 |
| | Histopathologie | 6 |
| | Übertragung des VHS-V | 8 |
| II. | PROBLEMSTELLUNG | 9 |
| III. | MATERIAL UND METHODEN | 11 |
| | A) Materialien | 11 |
| | Versuchstiere | 11 |
| | Virusstämme | 11 |
| | Zellkulturen | 12 |
| | B) Methoden | 12 |
| | Zellvermehrung | 12 |
| | Infektion der Versuchstiere | 13 |
| | Virusisolierung aus dem Blut der Fische | 13 |
| | Virusisolierung aus den Fischorganen | 14 |
| | Reinigung von Virusstämmen | 15 |
| | Virusreinigung und Viruskonzentrierung | 15 |
| | Quantitative Bestimmung der Virusinfektiosität (Virustiter) | 16 |
| | Plaque-Methode | 18 |
| | Berechnung der Plaque-bildenden Einheiten (PBE) aus -log $ID_{50}$ | 18 |
| | Antigennachweis mit der Immunfluoreszenztechnik (IF) | 18 |
| | Qualitativer Antikörpernachweis im Blutserum von Fischen | 20 |

Seite

Antikörpernachweis mit der Immunfluoreszenz (IF) 20
Antikörpernachweis mittels der Gegenstrom-Immunelektrophorese (GIE) 21
Autoradiographie 23
Qualitativer Nachweis von neutralisierenden Antikörpern mittels des Serumneutralisationstests 23
Histologische Untersuchungen 24
Hydrologische, physiographische und geologische Untersuchungen zu IV, D) 24

IV. ERGEBNISSE 26

A) Zur Bedeutung der Wassertemperatur (WT) auf den Krankheitsverlauf nach einer VHS-Infektion 26
Die Wassertemperatur (WT) im Zulauf einer Forellenteichwirtschaft 26
Der Einfluß der Wassertemperatur (WT) vor einer VHS-Infektion auf den späteren Krankheitsverlauf 28
Der Einfluß einer raschen Abkühlung der Wassertemperatur (WT) auf den Krankheitsverlauf nach einer VHS-Infektion 31
Verlauf einer VHS-Infektion bei andauernden Schwankungen der Wassertemperatur (WT) 36

B) Zur Problematik von apparent und inapparent verlaufenden VHS-Infektionen 38
Vergleich einer apparent und einer inapparent verlaufenden VHS-Infektion 38
Induktion einer akuten VHS aus einer inapparenten VHS-Infektion durch Verschlechterung der Umweltbedingungen 40
Vergleich der VHS-V-Isolierung aus dem Plasma und den Blutzellen und die Auswirkung auf den Krankheitsverlauf 42

Seite

C) Die Antikörper-Bildung und der Immunstatus von Regenbogenforellen nach überstandener VHS-Infektion 46

Nachweis von Antikörpern (Ak) in Regenbogen- und Bachforellen nach überstandener VHS-Infektion 46

Reinfektion von Regenbogenforellen nach überstandener VHS-Infektion 48

D) Epidemiologische Untersuchungen zur VHS in einem "Wildfischgewässer" 51

Beschreibung des Gewässersystems 51

Vorbericht und klinische Beobachtungen 52

Arbeitsplan 54

Ergebnisse der Felduntersuchungen 57

Experimentelle VHS-Infektion bei der Bachforelle (Salmo trutta fario L.) 60

Experimentelle VHS-Infektion beim Hecht (Esox lucius L.) 64

V. DISKUSSION 70

VI. ZUSAMMENFASSUNG 86

VII. LITERATUR 88

VIII. ANHANG 96

Verwendete Geräte 96

Chemikalien und sonstige Materialien 98

Medien, Puffer und Lösungen 98

LISTE DER ABKÜRZUNGEN

| | |
|---|---|
| Abb. | Abbildung |
| Ak | Antikörper |
| Ag | Antigen |
| BFAV | Bundesforschungsanstalt für Virus-krankheiten der Tiere, Tübingen |
| Bj | Baujahr |
| CHSE | Chinook salmon-embryo |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| FHM | Fathead Minnow |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| FN | Niederschlagseinzugsgebiet |
| g | Schwerkraft |
| GIE | Gegenstrom-Immunelektrophorese |
| GK | Gewässergüteklasse |
| ID | Immundiffusion |
| IE | Immunelektrophorese |
| IF | Immunfluoreszenz |
| IHN | Infektiöse Hämatopoetische Nekrose der Salmoniden |
| IHN-V | Virus der infektiösen hämatopoetischen Nekrose |
| i.p. | intraperitoneal |
| IpM | Impulse pro Minute |
| IPN | Infektiöse Pankreasnekrose der Salmoniden |
| IPN-V | Virus der infektiösen Pankreasnekrose |
| $KID_{50}$ | Kulturinfektiöse Dosis 50% |
| $-\log ID_{50}$ | negativer Logarithmus der Grenzverdünnung, bei der die Hälfte der Reagenten infiziert ist |
| $\mu$ | Ionenstärke |
| MEM-Hepes | Minimal Essential Medium + Hepeszusatz |
| Min. | Minuten |
| MS 222 | Narkosemittel (3-Aminobenzoesäure-ethylester-methansulfonat) |
| n.u. | nicht untersucht |
| PBE | Plaque-bildende Einheiten = pfu (plaque forming units) |

| | |
|---|---|
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| p.i. | post infectionem |
| PKD | Proliferative Kidney Disease der Forellen |
| Q | Wasserabfluß |
| RT | Raumtemperatur |
| RTG | Rainbow Trout Gonades |
| s.S. | siehe Seite |
| Std. | Stunde |
| TEN | Tris-EDTA-NaCl |
| Tris | Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan |
| UpM | Umdrehung pro Minute |
| VHS | Virale hämorrhagische Septikämie der Regenbogenforelle |
| VHS-V | Virus der viralen hämorrhagischen Septikämie |
| VT | Versen-Trypsin |
| WF | Wasserfläche |
| WT | Wassertemperatur |
| ZPE | Zytopathischer Effekt |
| ♀ | weiblich |

# I. EINLEITUNG

Die virale hämorrhagische Septikämie (VHS) der Regenbogenforelle gehört zu den wirtschaftlich bedeutendsten virusbedingten Fischkrankheiten. Die hohe Kontagiosität des Erregers führt zu bedeutenden Verlusten in den Forellenteichwirtschaften. Daher wurde diese Fischkrankheit in das am 28.03.1980 in Kraft getretene Tierseuchengesetz der Bundesrepublik einbezogen (Bundesgesetzblatt I, 1980, S. 386). Die bisherigen freiwilligen Bekämpfungsmaßnahmen sind durch die Fischseuchen-Schutzverordnung und die entsprechenden Richtlinien geregelt (Bundesgesetzblatt I, 1982, S. 382, 385).

Diese Fischkrankheit wurde von Schäperclaus 1938 erstmals unter der Bezeichnung "Infektiöse Nierenschwellung und Leberdegeneration" beschrieben, ohne daß der Erreger nachgewiesen werden konnte.

In einer Teichwirtschaft in der Nähe des dänisch-jütländischen Dorfes Egtved trat die Krankheit 1950 zum ersten Mal seuchenhaft auf. Bis zur Klärung der Virus-Ätiologie dieser Krankheit Mitte der 60er Jahre (Jensen, 1963; Zwillenberg et al., 1965) diskutierten viele Autoren sowohl die Ätiologie als auch die Bezeichnung dieser Seuche. Als Beispiele für die verschiedensten Namensgebungen seien nur einige genannt:

Bauchwassersucht der Forellen (Heuschmann, 1952; Liebmann, 1956), Neue Forellenkrankheit (Nuemann und Deufel, 1956; Klingler, 1957), Forellenseuche (Tack, 1957, 1959), L'Anémie pernicièuse (Besse, 1955, 1956), Syndrôme entéro-hépato-rénale (Bellet, 1958) und Egtved-Krankheit (Rasmussen, 1965).

Um international eine einheitliche Nomenklatur zu schaffen, wurde von der OIE (Office International des Epizooties) 1966 die Bezeichnung VHS empfohlen (zitiert nach Roberts und Schlotfeldt, 1985, S. 136). In neuerer Zeit hat Schlotfeldt die Berechtigung dieser Empfehlung in Frage gestellt, da "bei Nutzfischen diverse Syndrome sehr unterschiedlicher Ätiologie bekannt sind, die mit den Symptomen

einer hämorrhagischen Septikämie einhergehen" und die Bezeichnung VHS "lediglich auf einen klinisch-pathologischen Zustand hinweist" (zitiert nach Roberts und Schlotfeldt, 1985, S. 136). Dennoch hat sich bis heute die Bezeichnung VHS für die von dem VHS-V verursachte Krankheit gehalten.

Chemischer Aufbau und Morphologie des VHS-V

Das VHS-V besteht im wesentlichen aus den Komponenten der Virusmembran, den Nukleokapsidproteinen und der Ribonukleinsäure (RNS-Minus-Einzelstrang).

Die Virusproteine lassen sich als L-(Large)-Protein, das mit dem Nukleokapsid assoziiert ist, G-Protein (Glykoprotein der Virusmembran), N-Protein (Nukleokapsid-Protein), sowie als $M_1$- und $M_2$-Proteine (Membran- bzw. Matrixproteine) charakterisieren (Deuter, 1984).

Über die Stabilität des VHS-V geben Liversidge et al. (1985) genaue Auskunft. Das VHS-V ist säure-, hitze- und ätherlabil, dagegen ist es relativ widerstandsfähig gegen alkalische Lösungen.

Zwillenberg et al. (1965) beschrieben die Gestalt des VHS-V als geschoßförmig (bullet-shaped), wie sie für die Virionen der Familie Rhabdoviridae charakteristisch ist. Die Größe des Virions wurde mit 60-70x180 nm angegeben. In jüngerer Zeit wiesen mehrere Autoren aberrante Formen des VHS-V nach. Neben der klassischen Gestalt der Rhabdoviridae konnten verschiedene Formen beobachtet werden: sphärische bzw. polymorphe, den Paramyxoviren ähnliche Partikel; extrem lange, verzweigte sowie bacilliforme Partikel, die an beiden Enden abgerundet erscheinen (Olberding und Frost, 1975; Enzmann et al., 1980; Enzmann, 1985, pers. Mitteilung).

Diese verschiedenen Erscheinungsbilder des VHS-V stehen vermutlich in Zusammenhang mit dem jeweiligen Zellkulturmedium. So zeigten Enzmann et al. (1980), daß durch Detergenzbehandlung die

sphärischen bzw. polymorphen Viruspartikel wieder in langgestreckte Formen überführt werden können. Diese Beobachtungen lassen auf eine hohe Labilität der Virionen schließen.

Antigene Eigenschaften und Wirtsspektrum des VHS-V

In Europa konnten bei den bisher isolierten VHS-Virus-Stämmen drei Serotypen unterschieden werden:

1) Serotyp I ($F_1$) (Jørgensen, 1972).
Der Serotyp tritt in Europa am häufigsten auf und ist für ca. 90% der Krankheitsausbrüche verantwortlich. Gegen die frühere Meinung, daß nur Regenbogenforellen (Salmo gairdneri RICHARDSON, 1836) für diesen Serotyp empfänglich sind, sprechen die Berichte von Meier und Jørgensen (1980), Wizigmann et al. (1980) und Ahne (1985a), die VHS-V aus Hecht (Esox lucius L.), Äsche (Thymallus thymallus L.) und aus einer Coregonus-Spezies isolierten.

Experimentelle Infektionen waren beim Bachsaibling (Salvelinus fontinalis MITCHILL) (Tack, 1959), im Atlantischen Lachs (Salmo salar L.) (Liversidge et al., 1985), in der Goldforelle (S. aguabonita) (Ahne et al., 1976), in Hybriden der Regenbogenforelle und des Kirschlachses (S. gairdneri x Oncorhynchus kisutch WALBAUM) (Ord et al., 1976) möglich. Auch bei Seewasserfischen konnte die VHS experimentell induziert werden. Castric und de Kinkelin (1984) infizierten Wolfsbarsch (Diecentrarchus labrax L.) und Steinbutt (Scophthalmus maximus L.) mit dem Erreger der VHS.

2) Serotyp II ($F_2$) (Jørgensen, 1972).
Dieser Serotyp vermag sowohl Regenbogenforellen als auch Bachforellen (Salmo trutta fario L.) zu infizieren, ist jedoch in Deutschland seltener und hauptsächlich in Dänemark verbreitet.

3) Isolat 23.75 (de Kinkelin und Le Berre, 1977).
Dieser Serotyp beschränkt sich derzeit auf Frankreich und wurde vor allem aus Bachforellen isoliert. Er vermag Bach- und Regenbogenforellen zu infizieren (Liversidge et al., 1985).

Infektion und allgemeine Pathologie

Ab der 2.-4. Woche nach der ersten Futteraufnahme können alle Altersklassen der Regenbogenforellen von der Krankheit befallen werden.

Wie die meisten infektiösen Fischkrankheiten zeigt die VHS eine ausgeprägte Temperaturabhängigkeit. Schlotfeldt (1981) machte im norddeutschen Raum die Beobachtung, daß die Krankheit gegen Winterausgang und Frühjahrsbeginn am häufigsten ausbricht, um anschließend gegen Frühjahrsende und Sommeranfang bei steigenden Wassertemperaturen (WT) abzuklingen. Bei sinkenden WT im Herbst sind die Krankheitsausbrüche gehäuft zu beobachten. Die Winterausgangs - bzw. Frühjahrstemperaturschwelle um 7°-9°/10°C erachtet Schlotfeldt (1976, unveröffentlicht, zitiert nach Liversidge et al., 1985) als besonders kritisch. Ab 15°C bis 18°C ist die Krankheit kaum, ab 20°C praktisch überhaupt nicht mehr klinisch zu beobachten.

Die Inkubationszeit ist ebenfalls temperaturabhängig. Sie beträgt ca. sieben Tage bei einer WT von 8° bis 10°C. Neukirch (1984a) weist auf eine Abhängigkeit der Inkubationszeit und des Krankheitsverlaufs sowohl von der WT als auch vom Alter bzw. vom Gewicht der Fische hin. Niedrige Wassertemperaturen und zunehmendes Alter bzw. Gewicht der Fische verlängern die Inkubationszeit.

Die klinische Entwicklung eines VHS-Ausbruchs innerhalb einer bisher virusfreien Regenbogenforellen-Population erfolgt laut Ghittino (1965) nach einem dreiphasigen Schema.

Die erste, akute Phase geht mit hohen Verlusten innerhalb kurzer Zeit einher. Die erkrankten Fische zeigen apathisches Verhalten ("Randsteher") und eine Dunkelfärbung der Haut. Auffällige, äußerlich sichtbare Veränderungen sind Exophthalmus - teilweise mit periokulären Hämorrhagien -, herdförmige Blutinfiltrate an den Flossenansätzen und auf den abgeblaßten Kiemen sowie eine Anschwellung des Bauches. Diese Symptome treten je nach Schwere der Krankheit einzeln oder im Verbund auf.

Als makropathologische Befunde der inneren Organe können neben einem ausgeprägten Ascites Petechien bzw. Hämorrhagien in der Muskulatur, in den Kiemen und um die Gefäße des Peritoneums festgestellt werden.

Die zweite, chronische Phase zeigt klinisch wenig Unterschiede zur ersten Phase. Die Fische neigen jedoch zusätzlich zu plötzlichen Drehungen um die Längsachse. Zu den obengenannten pathologischen Veränderungen tritt eine hochgradige Anämie. Die Kiemen können sehr blaß werden, wobei Hämorrhagien dann nur noch selten sichtbar sind. Die Leber ist meist blaß oder sie zeigt als Folge herdförmiger Blutungen ein marmoriertes Aussehen. Am auffälligsten sind in dieser Phase die in der Skelettmuskulatur und im Peritoneum auftretenden Hämorrhagien.

Die Schwanzniere kann in diesem Stadium nodulär aufgetrieben und grau verfärbt sein. Diese Veränderung der Niere ist makroskopisch nicht nur für die VHS spezifisch, sondern auch die "Proliferative Nierenkrankheit" (PKD) der Forellen zeigt dieses Bild (Liversidge et al., 1985). Eine eindeutige differenzialdiagnostische Abgrenzung kann nur durch histopathologische Untersuchungen sowie durch serologischen Virusnachweis erfolgen.

Nach Enzmann (1980, 1981) werden in dieser Phase VHS-V-infizierte Lymphozyten in die Blutbahn freigesetzt. Dies kann zum Nachweis des Erregers herangezogen werden.

Während der dritten, sogenannten "nervösen" Endphase zeigen die erkrankten Fische zunehmend das oben erwähnte Schwimmverhalten. Die oben genannten makropathologischen Befunde treten in dieser Phase immer mehr zurück.

Über eindeutige diagnostische Merkmale der neurovegetativen Form, insbesondere über histopathologische Befunde des Nervengewebes, liegen wenige Untersuchungen vor. Gelegentlich gelingt eine Virusisolierung aus dem Gehirngewebe (Neukirch und Schlotfeldt, zitiert nach Roberts und Schlotfeldt, 1985, S. 141).

Histopathologie

Als histologische Befunde treten degenerative Erscheinungen unterschiedlichen Grades in den einzelnen Organen auf. Hierbei sind Kernpyknosen, Karyorrhexis, Nekrobiosen und fokale bis flächenhafte Nekrosen auffällig.

Obwohl die Kiemen als Eintrittspforte für das VHS-V angesehen werden, treten hier tiefgreifende Veränderungen nicht auf. Lediglich in den Sekundärlamellen können am Anfang der Infektion vakuolisierte Epithelien und vermehrt Pigmentmakrophagen beobachtet werden. Letztere werden als Zeichen einer Abwehrreaktion interpretiert (Wizigmann und Hoffmann, 1982).

Im hämopoetischen Teil der Niere (Kopfniere), die als "Targetorgan" angesehen wird, ist der Zerfall der Melanomakrophagen-Zentren charakteristisch (Amlacher et al., 1982). Das hämopoetische Parenchym wird zumeist bis auf wenige Restinseln reduziert. Erste Regenerationsvorgänge treten ab dem 16. Tag p.i. auf. Im leeren hämopoetischen Gewebe finden sich kleine Areale mit dicht gedrängt liegenden Hämozytoblasten. Gleichzeitig tritt eine diffuse Vermehrung von pigmenthaltigen Makrophagen hinzu (Wizigmann und Hoffmann, 1982).

Im sekretorischen Teil der Niere treten ab dem 7. Tag p.i. erste degenerative Veränderungen der Tubulusepithelien auf (Hoffmann et al., 1979). Finkenstädt (1979) beschreibt nach experimenteller VHS-Infektion eine Verdickung der glomerulären Basalmembran und eine verstärkte PAS-Reaktion (Perjod-Säure-Schiff) in den Zellen des proximalen Tubulus. Der Gewebsverband der Niere erscheint stark aufgelockert und zwischen den Nierenkanälchen fehlt teilweise das lymphoide Gewebe. Die Gefäße selbst sind zum Teil kollabiert und die Kapillarwände häufig aufgelöst (Stroh, 1960).

In der Milz sind am Anfang der Infektion einzelne Nekrosen der Sinusendothelien zu beobachten. Ab dem 9. Tag p.i. breiten sich diese auf die Retikulumzellen aus; ab dem 13. Tag p.i. kann eine starke Abnahme der Lymphozyten im retikulären Maschennetz der Milz beobachtet werden. Erythrozyten füllen diese Bereiche aus (Hoffmann et al., 1979).

Als erste Veränderungen der Leber werden von Hoffmann et al. (1979) Ansammlungen von Pigmentmakrophagen um die Gallengänge beschrieben. Ab dem 6. Tag p.i. treten fokale bis flächenhafte Nekrosen hinzu; die Gefäße und Sinusoide der Leber erscheinen oft blutleer (Schmid, 1960).

Hoffmann et al. (1979) beschreiben im Pankreas Veränderungen, die qualitativ weitgehend denen der Leber entsprechen und ab dem 7. Tag p.i. zu beobachten sind.

Im Herzen finden Wizigmann und Hoffmann (1982) vakuolige Degenerationen von Endokardzellen (ab dem 4. Tag p.i.); später treten herdförmig Rundzellinfiltrate im Myocard auf.

Veränderungen im Gehirn sind selten zu beobachten. Hoffmann et al. (1979) konnten bei drei Forellen eines Versuchsansatzes zwischen dem 35. und 49. Tag p.i. kleine Gliaproliferate, bei einem dieser Tiere zusätzlich eine nichteitrige Meningitis, feststellen.

Übertragung des VHS-V

Unter natürlichen Bedingungen ist anzunehmen, daß das VHS-V über das Wasser und durch direkten Kontakt übertragen wird (Ghittino, 1965). Als Eintrittspforte für das Virus werden die Kiemen diskutiert, wobei dem Epithel der Sekundärlamellen offenbar eine zentrale Bedeutung zukommt. Der direkte Virus-Nachweis im Epithel fehlt bislang (Wizigmann und Hoffmann, 1982). Allerdings konnte Chilmonczyk (1980) eine aktive Virusvermehrung in den Stützzellen der Sekundärlamellen feststellen.

Der Verdauungstrakt als Eintrittspforte wird bisher nicht ausgeschlossen, obwohl eine experimentelle orale Infektion bisher nicht induziert werden konnte. Dies gelingt vermutlich deswegen nicht, weil das Virus in dem sauren Milieu des Magens inaktiviert wird (Ghittino, 1970).

Als Übertragungsvektor des VHS-V vermuten Wizigmann und Hoffmann (1982) abgeschilferte Epithelzellen der Kiemen. Andererseits konnten Neukirch und Glass (1984) schon nach dem 3. Tag p.i. eine deutliche Virusausscheidung im Harn feststellen, ohne daß äußere Krankheitssymptome zu erkennen waren. Dabei wurde ein Virustiter von ungefähr $10^5$ $KID_{50}$/ml ($-\log ID_{50}$ 2.3/ml) ermittelt. Der höchste Wert lag bei $-\log ID_{50}$ 5.0/ml gegen Ende des Versuches.

Neben der horizontalen Verbreitung der VHS diskutieren Bellet (1958) und Zwillenberg und Zwillenberg (1968) den Flagellaten Hexamita salmonis als weiteren Vektor; hierzu liegen bisher jedoch keine eindeutigen Beweise vor.

Olesen und Jørgensen (1982) konnten dagegen eindeutig zeigen, daß dem Fischreiher (Ardea cinerea L.) eine bedeutende Rolle in der unmittelbaren Übertragung der VHS zukommt. Nachdem diese Vögel VHS-infizierte Forellen geschlagen hatten, war noch nach 60 Minuten an ihrem Schnabel infektiöses VHS-V zu finden.

## II. PROBLEMSTELLUNG

Die immer wieder auftretenden Ausbrüche der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHS) bei Regenbogenforellen auch in solchen Teichwirtschaften, in denen über mehrere Jahre kein Seuchengeschehen zu beobachten war, warf die Frage auf, welche Bedingungen einen Ausbruch der Seuche begünstigen. Es galt zu überprüfen, inwieweit einerseits das VHS-V ein Reservoir in der Wildfischpopulation findet, und weiterhin welche abiotischen Faktoren als Auslöser der Seuche in einem Endemiegebiet in Frage kommen. Daß ein Ausbruch der VHS neben anderen Umweltfaktoren besonders vom Einfluß der Wassertemperatur (WT) abhängt, ist bekannt und von verschiedenen Autoren untersucht worden (Dorson und de Kinkelin, 1974; Kölbl, 1978; Neukirch, 1984). Jedoch blieben in den Versuchen mit jeweils konstanten WT die natürlichen Verhältnisse in den Teichanlagen außer acht.

Aus den Untersuchungen zur WT im Zulauf eines Fischzuchtbetriebes ergab sich die Vermutung, daß besonders die Änderung der WT auf den Krankheitsverlauf einer VHS-Infektion Einfluß nimmt. Gezielte Untersuchungen zur Reaktion der Forellen nach einer VHS-Infektion auf unterschiedliche Temperaturverhältnisse wurden angeschlossen.

In der Natur wie in den Laborversuchen fiel auf, daß beim Virusnachweis bei den Regenbogenforellen die Palette der Krankheitsbilder vom symptomlosen Krankheitsverlauf bis hin zu deutlichen klinischen Anzeichen der Krankheit reichte, wobei die Mortalität von Einzelverlusten bis hin zu 100% betrug. Es galt daher, inapparente Infektionsverläufe mit apparenten zu vergleichen und die Möglichkeit einer Induktion eines akuten VHS-Ausbruchs durch die Veränderung der Umweltbedingungen zu überprüfen. Daneben sollte der Immunstatus der Regenbogenforellen nach überstandener Infektion untersucht werden.

Die vermehrten VHS-Ausbrüche im Süden von Baden-Württemberg im Frühjahr 1983 gaben Anlaß zu der Überlegung, ob diese Ausbrüche durch Neueinschleppung des Erregers in die Teichanlagen verursacht

worden waren oder ob der Erreger in den betreffenden Gebieten endemisch ist. An einem als Modellsystem geeigneten Gewässer sollte geprüft werden, ob die Einschleppung des Erregers in die betreffende Teichwirtschaft durch mangelnde Hygiene oder andere belebte oder unbelebte Vektoren (bzw. VHS-"Carrier"-Fische, Vögel etc.) erfolgte oder ob der Erreger aus dem Bach in die Teichwirtschaft übergegangen war. Der Bach als mögliche Infektionsquelle machte es notwendig, andere Fischarten, die als Virusreservoir in Frage kamen, auf ihre Empfänglichkeit gegenüber dem VHS-V zu untersuchen.

Durch die Vielfalt der angeführten Versuche erscheint es nicht sinnvoll, die einzelnen Problemstellungen hier näher auszuführen, im Ergebnisteil wird statt dessen jeweils eine Einführung in die betreffende Versuchsanordnung gegeben.

# III. MATERIAL UND METHODEN

## A) Materialien

### Versuchstiere

Zu Beginn der Untersuchungen konnten Regenbogenforellen von einer kommerziellen Fischzuchtanlage bezogen werden, die als seuchenunverdächtig ausgegeben wurde. Diese Fische hatten ein durchschnittliches Körpergewicht von ca. 200 g.

Vom Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. in Grub konnten später spezifisch pathogenfreie Forellenbrütlinge erworben werden, die in den eigenen Hälteranlagen bis zu einem Gewicht von ca. 100 bis 200 g aufgezogen wurden.

Die Hechte (Esox lucius L.) wurden als Setzlinge ($H_1$) von einer kommerziellen Fischzuchtanstalt bezogen und in den hauseigenen Hälteranlagen zu einer Größe von ca. 35 cm aufgezogen. Vor der experimentellen VHS-Infektion wurden die Fische auf spezifische Ak mittels der Gegenstrom-Immunelektrophorese und des Serumneutralisationstests geprüft (s. S. 21 und s. S. 23).

Die Bachforellen (S. trutta fario L.) wurden einerseits aus dem Quellbereich eines Baches entnommen, andererseits von einer kommerziellen Fischzuchtanlage erstanden. Auch diese Tiere wurden vor Versuchsbeginn auf eventuell vorhandene Ak geprüft.

### Virusstämme

Das VHS-V (Stamm $F_1$) erhielt die BFAV vom Fischgesundheitsdienst Niedersachsen, bei späteren Versuchen wurde ein eigenes Feldisolat (FI13) für die Infektionsversuche eingesetzt. Dieses Virus hatte einen Titer von $2{,}6 \times 10^7$ PBE/ml. Zur Überprüfung der VHS-Natur des Feldisolates kam die 3. Zellkulturpassage fünfmal zur Endpunkttitration (s. S. 15), anschließend zur Reinigung über einen

Saccharosedichtegradienten (s. S. 15) und zur elektronenmikroskopischen Betrachtung; außerdem erfolgte eine serologische Überprüfung. Ferner wurde das Feldisolat von Herrn Prof. Dr. Wizigmann, Tiergesundheitsdienst Bayern e.V. in Grub auf das Virus der infektiösen Pankreasnekrose (IPN-V) geprüft. IPN-V konnte dabei nicht nachgewiesen werden.

Zellkulturen

CHSE-Zellen: Diese Zellen stammen aus den Embryonen des Chinook Salmon (Oncorhynchus tshawytscha, WALBAUM; Chinook salmon embryo) (Fryer et al., 1965).

FHM-Zellen: Diese Zellen stammen aus dem kaudalen Rumpf der "Dickkopf"-Elritze (Pimephales promelas RAFINESQUE; Fathead Minnow) und sind epitheloid (Gravell und Malsberger, 1965).

RTG-2-Zellen: Rainbow trout gonades, stammen aus den ♀ Gonaden der Regenbogenforelle (Salmo gairdneri RICHARDSON; Wolf und Quimby, 1962).

Die Zellen wurden von der Fa. Flow, Bonn bezogen.

B) Methoden

Zellvermehrung

Für die Kultivierung der RTG-2-, FHM- und CHSE-Zellinien fand MEM Verwendung, das mit folgenden Zusätzen versehen war:

| | |
|---|---|
| 10% FKS | (30 Min. bei 56°C hitzeinaktiviert) |
| Bykomycin | (163 IE/ml Kulturmedium) |
| Penicillin | (200 IE/ml Kulturmedium) |
| Tylosintartrat | (50 µg/ml Kulturmedium) |
| Hepes | (3,34 g/l Kulturmedium) |

Die Zellen bildeten nach ca. drei Tagen (bei 20°C) in 75 $cm^2$ großen Plastikzellkulturflaschen einen dichten einschichtigen Zellrasen (Monolayer) aus. Nach Ablösen mit Hilfe von VT konnten die Zellen im Verhältnis 1:2 bis 1:3 auf neuen Kulturflaschen ausplattiert werden.

Infektion der Versuchstiere

Die Versuchstiere wurden anfänglich i.p. oder durch Übertragung des VHS-V mit einem feinen Pinsel auf die Kiemen infiziert. Um eine natürliche Infektion mit VHS-V nachzuahmen, wurden die Forellen bei den späteren Versuchen über das Wasser (waterborne) infiziert. Das Infektionsbad wies im Mittel einen Titer von $1{,}5 \times 10^6$ PBE/ml auf, und die Fische verblieben dort zwei Stunden lang. Anschließend kamen die Tiere in ein Wasserbad, um überschüssiges Virus abzuspülen. Erst dann wurden sie in die Versuchsanlagen zurückgesetzt. Nach drei Tagen wurden zu den VHS-V-infizierten Forellen jeweils einige nicht infizierte Kontrollfische hinzugesetzt. Nur wenn die Kontrolltiere ebenfalls an der VHS erkrankten, wurde der Infektionsversuch ausgewertet. Da an dieser Stelle der Infektionsmodus nur allgemein dargestellt werden kann, sind nähere Angaben über Infektionswege, Wassertemperatur und Virusdosis im einzelnen aus den jeweiligen Versuchsbeschreibungen zu entnehmen.

Virusisolierung aus dem Blut der Fische

Die Blutmenge der meisten Süßwasserfische beträgt nur annähernd 2% des Körpergewichts, daher kann bei kleineren Fischen maximal 1% des Körpergewichts an Blut abgenommen werden (Lehmann und Stürenberg, 1980).

Die Blutentnahme erfolgte meist durch Punktion der Schwanzvene oder des Herzens am narkotisierten Fisch (MS 222, 1:100000). Mußten demselben Tier mehrere Blutproben zu verschiedenen Zeiten entnommen werden, wurde die Schwanzvenenpunktion bevorzugt.

Nach Abzentrifugieren des Blutkuchens (3000 UpM, 30 Min., 4°C) wurde der Serumüberstand abgenommen, 1:10 oder 1:100 mit 2% FKS-haltigem MEM-Hepes verdünnt und auf konfluente Zellkulturen verimpft (1 ml Serumgemisch auf 75 $cm^2$ Monolayer). Nach der Inkubation (1 h, 20°C) wurden 9 ml des obengenannten Mediums zugegeben und die Kultur bei 15°C weiter bebrütet. Nach 3 bis 4 Tagen p.i. trat ein zytopathischer Effekt (ZPE) auf, der daran zu erkennen war, daß sich die Zellen abgekugelt und vom Boden der Kulturflasche gelöst hatten.

Das virushaltige Kulturmedium wurde abgenommen und bei 3000 UpM 30 Min. lang zentrifugiert. Dabei sedimentierten die im Kulturmedium vorhandenen Zelltrümmer, und das Virus verblieb im Überstand.

Virusisolierung aus den Fischorganen

Für die Isolierung des VHS-V aus den Organen wurden letztere den Fischen unter möglichst sterilen Bedingungen entnommen und einzeln aufgearbeitet. Bei den Forellen wurden folgende Organe untersucht: Kiemen, Leber, Milz, Pylorus mit Pankreas, Niere und Gehirn, bei den Hechten nur: Kiemen, Leber, Milz und Niere.

Die Organproben wurden in MEM-Hepes mit Zusatz von 10% FKS und Antibiotika (s. S. 12) mittels Seesand in Reibschalen homogenisiert. Je nach Größe der Organstücke wurde 0,1 ml bis 1 ml MEM-Hepes zugegeben.

Nach der Zentrifugation (6000 UpM, 1 Std., 4°C) wurde die Infektiosität des Überstandes quantitativ bestimmt (s. S. 16). War nach siebentägiger Bebrütungszeit der Zellkulturen (15°C, 2% $CO_2$-Gehalt) kein ZPE zu beobachten, wurde eine Blindpassage angeschlossen.

Reinigung von Virusstämmen

Bei der Reinigung von Virusstämmen geht man von der Voraussetzung aus, daß ein Plaque durch eine infektiöse Viruseinheit gebildet wird. Damit kann das Virus, das von einem Plaque gebildet wird, als die Nachkommenschaft einer infektiösen Einheit angenommen werden (Mayr et al., 1974).

Da im "Fisch-System" sowohl das Virus als auch die Zellkulturen sehr temperaturempfindlich sind, kann eine Virusisolierung in halbflüssigem Medium durch Agarose-Zusatz nicht erfolgen.

Aus diesem Grund wurde das auf Seite 11 beschriebene, isolierte VHS-V in log10-Verdünnungsstufen auf konfluente RTG-2-Zellkulturen in einer Mikrotiterplatte verimpft (s. S. 17). Nach einer Bebrütungszeit von sieben Tagen bei 15°C (2%-$CO_2$-Gehalt) entnahm man den gesamten Mediumüberstand der Zellkultur, die nur ein Plaque aufwies (1. Endpunkttitration). Mit diesem Überstand wurden nacheinander vier weitere Endpunkttitrationen durchgeführt. Das auf diese Weise gereinigte VHS-V kam, wie auf Seite 14 beschrieben, zur weiteren Vermehrung.

Virusreinigung und Viruskonzentrierung

Für die elektronenoptische Betrachtung des oben besprochenen VHS-V-Stammes war es notwendig, die Virussuspension von Zelltrümmern und anderen möglichen Verunreinigungen zu befreien. Zu diesem Zweck wurden folgende Methoden angewandt:

1) Die Vorklärung des VHS-V-haltigen Zellkulturüberstandes erfolgte durch Zentrifugation bei 3000 UpM (30 Min., 4°C).
2) Das Virus wurde mittels Ultrazentrifugation durch eine 20%-ige (Gew.-% in TEN) Saccharose-Lösung (25000 UpM, 120 Min., 4°C) konzentriert und anschließend in TEN-Puffer resuspendiert.
3) Die Reinigung des Viruskonzentrats erfolgte in einer Gleichgewichts-Zentrifugation in einem vorgefertigten

Saccharose-Gradienten. Bei der Gleichgewichts-Zentrifugation wandern die Partikel im Schwerefeld durch den Dichtegradienten, bis sie in den Dichtebereich des Zuckergradienten gelangen, der ihrer eigenen Dichte entspricht.

Hierbei kamen vorgefertigte 10%-ige bis 60%-ige (Gew-% in TEN) Saccharose-Gradienten zur Anwendung, die in 10%-Schritten geschichtet worden waren. Das Viruskonzentrat wurde diesem Gradienten überschichtet und 24 Std. lang bei 35000 UpM (4°C) zentrifugiert. Das mit diesem Verfahren gereinigte Virusmaterial ist als Bande im Streulicht sichtbar. Zur Abnahme der Virusbande wurde der Boden des Zentrifugenröhrchens mit einer Kanüle durchstochen, und der entsprechende Dichtebereich entnommen.

Quantitative Bestimmung der Virusinfektiosität (Virustiter)

Bei der quantitativen Bestimmung des Virusgehalts (als $ID_{50}$) in einer Suspension werden die "infektiösen Viruseinheiten" ermittelt, nicht die absolute Zahl der Viruspartikel. Zwischen der Anzahl der Viruspartikel und den infektiösen Einheiten besteht eine erhebliche Differenz (Mayr et al., 1974).

Die Bestimmung des Virusgehalts einer Suspension nach der "Alles- oder Nichts-Reaktion" erfolgt auf Grund der Schätzung der mittleren Infektionsdosis nach mathematischen Verfahren. Dabei wird die höchste Verdünnung der Virussuspension ermittelt, die in Zellkulturen noch zu einem ZPE führt.

Für die mathematische Auswertung nach Kaerber (1931) ist es notwendig, daß zwei Reagentengruppen vorhanden sind. Die eine Gruppe muß in ihrer Gesamtheit positiv reagieren, die andere Gruppe muß in ihrer Gesamtheit negativ reagieren. Zwischen diesen beiden Verdünnungsstufen liegt dann diejenige Verdünnung, bei der die Hälfte der Reagenten positiv, die andere Hälfte negativ reagiert. Man spricht jetzt von einer Infektionsdosis, bei der 50% der Zellkulturen infiziert sind. Die Angabe erfolgt als $-\log ID_{50}$.

Die Virustitration, sowohl der Blutseren als auch der Organproben, kann auf zwei Arten durchgeführt werden:

1) Durch die Simultan-Methode, bei der die jeweiligen Virus-Verdünnungsstufen sofort in die frisch ausgesäte Zellsuspension verimpft werden.
2) Durch die Sukzessiv-Methode, bei der die jeweiligen Virus-Verdünnungsstufen auf konfluente Zellkulturen verimpft werden.

Die zweite Methode hat den Vorteil, daß die Zellen durch eventuelle zytotoxische Komponenten der Fischseren weniger geschädigt werden, da die Zellen bereits ausgewachsen sind. Dieses Verfahren neigt weniger zu unspezifischen Reaktionen, daher wurde ihm der Vorzug gegeben.

Die Bestimmung des Virusgehalts erfolgte nach den Arbeitsvorschriften von Wizigmann et al. (1983) auf Mikrotiterplatten.

Die Titerberechnung der einzelnen Virussuspensionen erfolgte nach siebentägiger Bebrütungszeit auf Grund des vorhandenen ZPE nach der Formel:

$$-\log ID_{50} = \sum \frac{X_i + X_{i+1}}{2} \times (h_i - h_{i+1})$$

wobei $X_i$ = - log der i-ten Virusverdünnung
$h_i$ = relative Häufigkeit positiver Reagenten bei $X_i$
(= Anzahl positiver Reagenten/Anzahl getesteter Reagenten)

oder anhand der von Lorenz (1960) berechneten Tabellen zur näherungsweisen Bestimmung von Infektiositäts- und Neutralisationstitern.

Alle Virustiterberechnungen beziehen sich dabei auf jeweils 25 µl eingesetzte Virussuspension.

Plaque-Methode

Für die Virusisolierung aus den Blutzellen und dem Plasma infizierter Regenbogenforellen wurde die Plaque-Methode in Zellkulturflaschen angewandt.

Nach Inkubation (1 Std., 20°C) auf konfluenten Zellkulturen wurde das Inokulum abgezogen und die Zellkulturen mit 10 ml Plaque-Medium überschichtet. Nach siebentätiger Bebrütungszeit (15°C) wurden die Zellkulturen mit einem Formalin-PBS-Gemisch fixiert, anschließend mit Leitungswasser abgewaschen und getrocknet. Nach der Trocknung wurde der Zellrasen mit Giemsa gefärbt (30 Min., RT), nochmals gewaschen und getrocknet. Danach konnten die Plaques ausgezählt werden.

Berechnung der Plaque-bildenden Einheiten (PBE) aus -log $ID_{50}$

Der Virustiter, der für die Infektion der Regenbogenforellen zur Anwendung kam, wird in PBE/ml angegeben, da aus dieser Angabe die Anzahl der eingesetzten infektiösen Viruspartikel genauer ablesbar ist.

Die Umrechnung von -log $ID_{50}$ auf PBE erfolgt nach der Formel (Lorenz, 1964):

$M = m-0,251$ wobei:
M = log Anzahl PBE
m = log $ID_{50}$

Antigennachweis mit der Immunfluoreszenztechnik (IF)

Mittels der IF in Verbindung mit einem spezifischen Anti-VHS-Serum ist es möglich, die Virusidentifizierung durch den Antigennachweis durchzuführen. Als Standardmethoden, die in Mayr et al. (1977) ausführlich beschrieben sind, kommen die direkte oder indirekte IF in Betracht.

Für den Antigennachweis wurde die direkte Methode der IF angewandt. Bei der direkten IF sind die spezifischen Antikörper mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) markiert, d.h., die Antigene werden durch die homologen Antikörper nachgewiesen. Das FITC-markierte Anti-VHS-Konjugat stellte freundlicherweise Dr. Enzmann, BFAV Tübingen, zur Verfügung.

Der Antigennachweis erfolgte auf RTG-2-Zellkulturen, die auf runden Deckgläsern (Glasstärke 3, ϕ14 mm) in Linbro-Platten zu einem Monolayer ausgewachsen und mit dem jeweiligen VHS-V infiziert worden waren. Bei der Verwendung von Zellkulturen, die in Plastik-Kulturflaschen kultiviert wurden, war es notwendig, die glatte Oberfläche der Deckgläser mit einem Polymer zu behandeln, damit sich die Zellen festsetzen konnten. Zu diesem Zweck kamen die Deckgläser in eine 5%-ige (Gew.-%) Poly-L-lysin-Lösung (Yaron und Berger, 1963). Nach 30 Min. wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen und anschließend getrocknet. (Die vorbereiteten Deckgläser können in einem luftdicht verschlossenen Gefäß bei 4°C einige Tage aufbewahrt werden).

Folgende Arbeitsgänge waren für die direkte IF notwendig:

- Anzucht eines RTG-2-Monolayers auf den Deckgläsern in Linbro-Platten (Costar, 24 Well). Dabei wurde 1 ml Zellsuspension (ca. $5x10^5$ Zellen/ml) ausgesät.
- Verimpfung des zu testenden Materials (1:100 verdünntes Serum in MEM-Hepes + 10% FKS und Antibiotikazusatz). Nach 1 Std. Inkubationszeit (20°C, 2% $CO_2$-Gehalt) wurde das Inokulum abgezogen und 1 ml 2% FKS-haltiges MEM-Hepes zugegeben.
- Bei den ersten Anzeichen von Plaque-Bildung wurde der Zellrasen mittels gekühlten Acetons oder eines Aceton-Äthanol-Methanol-Gemischs (60%, 25%, 15%) 10 Min. lang fixiert.
- Waschen der Präparate mit PBS (dreimal), anschließend Trocknung derselben.
- Überschichtung der Zellkulturen mit dem spezifischen Anti-VHS-Konjugat (30 Min. bei RT).

- Waschen der Präparate mit PBS (dreimal) und Aqua dest. (einmal).
- Einbettung der Präparate auf Objektträger in ein Glycerin-PBS-Gemisch (s. S. 101).

Die Auswertung der Präparate erfolgte unter einem Epifluoreszenzmikroskop (s. Geräteliste).

Qualitativer Antikörpernachweis im Blutserum von Fischen

Das Vorhandensein von Ak im Blutserum von Fischen gilt als Zeichen für eine überstandene Infektion. Für den Nachweis der Ak stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die hier angewandten Methoden waren:

Antikörpernachweis mittels der Immunfluoreszenz (IF)
Antikörpernachweis mittels der Gegenstrom-Immunelektrophorese (GIE)
Nachweis neutralisierender Antikörper mit Hilfe des Serumneutralisationstests.

Antikörpernachweis mit der Immunfluoreszenz (IF)

Die IF kann in modifizierter Form auch zum Nachweis von spezifischen Ak herangezogen werden. Das System der direkten IF wurde dahingehend geändert, daß bei Vorhandensein von spezifischen VHS-Ak die Fluoreszenz "gelöscht" wurde. Somit könnte diese Technik als "Fluoreszenz-Lösch-Test" bezeichnet werden. Die Methode sei hier kurz dargestellt.

VHS-infizierte RTG-2-Monolayer wurden nach dem auf Seite 19 beschriebenen Schema angelegt, und bei den ersten Anzeichen von Plaquebildung mit Aceton oder einem Aceton-Äthanol-Methanol-Gemisch fixiert (s. S. 19). Diejenigen Präparate, die als positive VHS-Kontrollen herangezogen werden sollten, wurden mit spezifischem Anti-VHS-Konjugat (FITC-markiert) überschichtet und 30 Min.

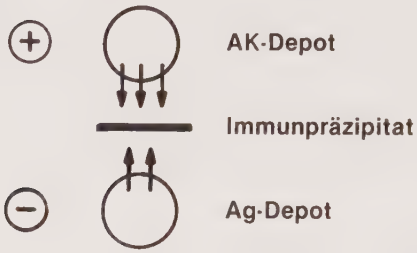
inkubiert (bei RT). Nach dreimaligem Waschen in PBS und einmaligem Waschen in Aqua dest. kamen die Präparate zur Eindeckung in ein Glycerin-PBS-Gemisch. Die VHS-infizierten Zellen waren unter dem Fluoreszenzmikroskop gut zu erkennen.

Für den Ak-Nachweis mit Hilfe dieser Technik wurde vor dem Anti-VHS-Konjugat das zu prüfende Fischserum inkubiert (30 Min. bei RT). Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde, wie oben beschrieben, fortgefahren. Waren die Fischseren Ak-positiv, so war die Fluoreszenz der infizierten Foci "gelöscht".

Ak-Nachweis mittels der Gegenstrom-Immunelektrophorese (GIE)

Bei der Gegenstrom-Immunelektrophorese wandert das Ag im elektrischen Feld in Richtung Anode. Unter definierten Pufferbedingungen entsteht in einem Agarosegel mit hoher Elektroendosmose in Richtung Kathode ein Flüssigkeitsstrom, in dem die Ak mitgerissen werden (Gocke und Howe, 1970). In der Äquivalenzzone zwischen Ag- und Ak-Depot entsteht eine Präzipitationslinie aus Ag und Ak (Abb. 1). Gegenüber der Immundiffusion (ID) ist die Methode der GIE wesentlich sensitiver, da alle vorhandenen Ak und alles Ag in der Präzipitationslinie gebunden werden, während sich die Reaktionspartner bei der radialen ID nur in einem eng begrenzten Kreisausschnitt treffen.

Abb. 1: Schematische Darstellung der Gegenstrom-Immunelektrophorese (GIE)




Das Ag wandert im elektrischen Feld in Richtung Anode, während die Ak im Flüssigkeitsstrom des Agarosegels in Richung Kathode mitgerissen werden. In der Äquivalenzzone entsteht das Immunpräzipitat.

Mit Hilfe eines radioaktiv markierten Ag kann die Methode der GIE weiter sensitiviert werden, da auf der anschließend durchgeführten Autoradiographie der getrockneten Gelplatte die Präzipitate genau zu lokalisieren sind (s. S. 23 und Abb. 14).

Die Markierung des hochgereinigten VHS-V (s. S. 15) erfolgte mit $^{125}$Jod nach der Chloramin-T Reaktion und wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Enzmann durchgeführt. Als Gel kam ein Gemisch aus NaCl, Tris, EDTA und Agarose (1%, Gew.-%, hohe Elektroendosmose) in Aqua dest. (oder Barbitalpuffer, pH 8,2) zur Anwendung. Barbitalpuffer ($\mu$ = 0,025) wurde als Elektrodenpuffer verwendet. Der pH-Wert der Gelflüssigkeit und des Elektrodenpuffers wurde jeweils auf pH 8,2 eingestellt.

Nach dem Ausgießen des Gels auf spezielle Trägerplatten (Gelfix, Serva) und nach seinem Erstarren wurden 4 mm große, sich gegenüberliegende Löcher gestanzt. In diese Ak- bzw. Ag-Depots konnten ca. 20 µl Serum bzw. Ag einpipettiert werden. Markiertes Ag

wurde mit unmarkiertem Ag, das zuvor mit Triton X-100 (30 Min., bei 4°C) behandelt worden war, gemischt, so daß im Mittel ca. 200000 lpM/ml zum Einsatz kamen.

Bei einer elektrischen Feldstärke von 5V/4 cm dauerte die GIE insgesamt 90 Min., wobei zunächst die Ak 30 Min. im "Vorlauf" alleine wanderten. Nach dem Lauf wurde die Gelplatte mehrmals in einmolarer NaCl-Lösung und anschließend in Aqua dest. gewässert, um unspezifischen Hintergrund zu entfernen. Die getrocknete Gelplatte kam schließlich zur Färbung mit Coomassie-Blue und zur Autoradiographie.

Autoradiographie

Die Autoradiographie erlaubt eine sehr genaue Lokalisierung des radioaktiv-markierten Ag. Weiterhin liegt die Nachweisgrenze für radioaktiv-markierte Proteine im Vergleich zu den üblichen Färbemethoden deutlich höher.

Bei den durchgeführten Autoradiographien wurde die Kontaktmethode angewendet, d.h., das getrocknete Gel wurde zwischen zwei Platten in engen Kontakt mit dem Röntgenfilm gebracht und für 48 Std. in einer lichtundurchlässigen Kammer exponiert. Die Entwicklung des Röntgenfilms dauerte im Röntogen-Entwickler (Tetanal) 5 Min. (1 Teil Entwickler, 4 Teile Wasser); die Fixierung dauerte im Tetanal-Schnellfixierbad (1 Teil Tetanal, 7 Teile Wasser) ebenfalls 5 Min. Nach zehnminütiger Wässerung in fließendem Wasser wurden die Filme getrocknet.

Qualitativer Nachweis von neutralisierenden Ak mittels des Serumneutralisationstests

Die Bestimmung der neutralisierenden Ak erfolgte nach der Serumverdünnungsmethode auf konfluenten RTG-2-Zellkulturen (Sukzessiv-Methode). Als Grundlage für das Nachweisverfahren diente die Arbeitsvorschrift von Wizigmann et al., (1983). Sie wurde jedoch

dahingehend modifiziert, daß anstelle der dort angegebenen Serumverdünnungsstufen die Stufen 1:4, 1:8 und 1:16 zur Anwendung kamen.

Histologische Untersuchungen

Für die histologischen Untersuchungen wurden folgende Organe herangezogen:

Kiemen, Thymus, Leber, Milz, Pylorus mit Pankreas, Herz, Niere (aufgeteilt in Kopf-, Rumpf- und Schwanzniere) und Gehirn.

Die Organe wurden in 10%-igem Formalin 24 Std. lang fixiert, über die übliche Alkohol- und Xylol-Reihe gebracht und in Paraplast eingebettet. Fünf µm dicke Schnitte der Organe wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (Romeis, 1968).

Hydrologie, physiographische und geologische Untersuchungen zu IV. D)

Die hydrologischen Angaben des unter IV. D) beschriebenen Gewässers wurden wie folgt ermittelt:

Niederschlags-Einzugsgebiet (FN)

Das Einzugsgebiet ist auf die Mündung des Gewässers bezogen. Die Angabe von FN stammt aus der Dokumentenmappe des Wasserwirtschaftsamtes Sigmaringen.

Wasserabfluß (Q)

Die Wasserführung ist in kleinen Vorflutern ohne Pegelschreiber nicht genau erfaßbar. Die Angaben des Wasserabflußes Q wurden

freundlicherweise von Herrn Schütterle, Wasserwirtschaftsamt Sigmaringen berechnet. Die Werte Q beziehen sich auf die Stelle (3) in Abbildung 18.

Wasserfläche der Seen (WF)

Dokumentenmappe Landwirtschaftsamt Rottweil.

Gewässergüteklasse (GK)

Gewässerkarte Baden-Württemberg (1981).

Geographische Verhältnisse

Topographische Karte (TK) 1:50000 des Landesvermessungsamts Baden-Württemberg. Auf die Angaben des TK-Blattes und die Koordinaten des Gewässersystems wurde zur Wahrung des Datenschutzes verzichtet.

Geologische Verhältnisse

Geologische Karte von Baden-Württemberg (1981), 1:200000, Blatt 4.

## IV. ERGEBNISSE

### A) Zur Bedeutung der Wassertemperatur (WT) auf den Krankheitsverlauf nach einer VHS-Infektion

#### Die Wassertemperatur (WT) im Zulauf einer Forellenteichwirtschaft

Der untersuchte Forellenzuchtbetrieb wird von Bachwasser gespeist, das nach der Einteilung von Dyk (1940) in die Kategorie "rasche, gut beschattete Bäche des Hochlands" zu rechnen ist. Nach seiner Einteilung sollen diese Fließgewässer in den Sommermonaten eine WT von 18°C bis 20°C aufweisen. Die tagesrhythmischen Schwankungen der WT betragen dabei 3°C bis 4°C.

Die milde Witterung in den ersten Monaten des Frühjahrs 1983 (März bis April) ließ die WT der meisten oberflächenabhängigen Fließgewässer bis auf 17°C ansteigen. Die Wasserführung der meisten Vorfluter bewegte sich um den mittleren Wasserstand. Diese Voraussetzungen versprachen für die betroffene Fischzucht einen guten Ertrag. Ein Wetterumsturz im Mai desselben Jahres führte zu Hochwasser und innerhalb weniger Tage zu einer raschen Abkühlung der WT auf 8°C oder darunter. Zu diesem Zeitpunkt fand der Teichwirt in einem seiner Teiche verendete Junghechte (Esox lucius L.), die nur aus den flußaufwärtsgelegenen Seen stammen konnten. Kurze Zeit später brach in diesem Betrieb die VHS aus.

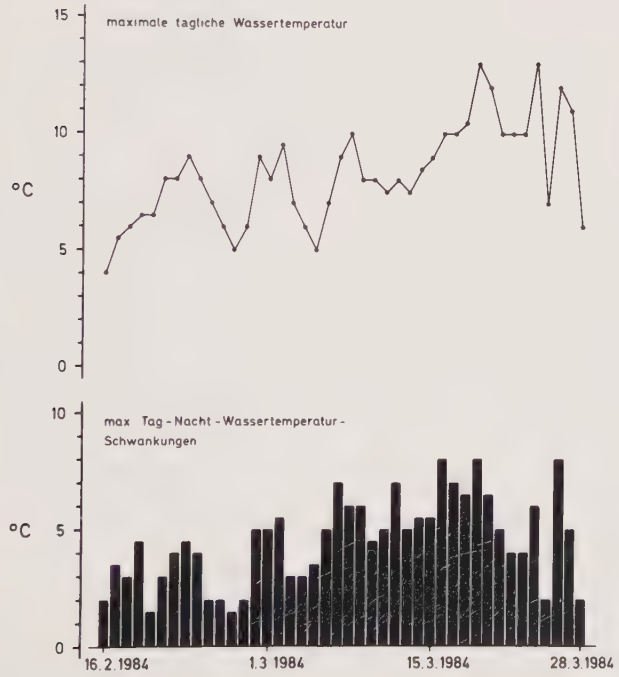
Drei Wochen später wurde auch in einem zweiten, etwa drei Kilometer flußabwärts anrainenden Forellenzuchtbetrieb die Seuche diagnostiziert.

Während der folgenden Sommermonate versuchten die Teichwirte ihre Betriebe zu sanieren. Im Dezember 1983 kam es dennoch zu einem zweiten Seuchenausbruch. Da nicht der gesamte Fischbestand betroffen war, verblieben die Regenbogenforellen bis zum Mai 1984 in den Teichen; erst dann wurden alle Teiche vollständig abgefischt und desinfiziert.

Im Jahre 1984 wurde im Zulauf des ersten Forellenzuchtbetriebes ($FZ_1$, Lage siehe in Abb. 18) eine kontinuierliche Messung der WT durchgeführt, um eine fundierte, von den Teichwirten unabhängige Aussage über die Schwankungen der WT zu gewinnen. Unser Interesse galt dabei einem möglichen Zusammenhang zwischen einer Abkühlung des Wassers und einem VHS-Ausbruch. Die WT wurde mittels eines Temperaturschreibers vom 16. Februar bis zum 28. März 1984 kontinuierlich aufgezeichnet.

In Abbildung 2 ist die Ganglinie der maximalen WT im Untersuchungszeitraum aufgetragen. Die Temperaturunterschiede betrugen selbst in dieser kühlen Jahreszeit von Tag zu Tag bis zu 7°C.

Abb. 2: Wassertemperatur im Zulauf einer Forellenteichwirtschaft (Februar bis März 1984)

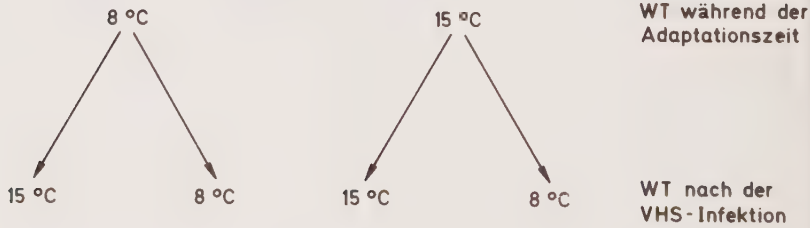


Das Säulendiagramm vermittelt die Schwankungen der WT im Tag-Nacht-Rhythmus. Hierbei betrug die maximale Temperaturdifferenz bis zu 8°C innerhalb 24 Stunden.

Der Einfluß der Wassertemperatur (WT) vor einer VHS-Infektion auf den späteren Krankheitsverlauf

Ziel der Fragestellung war herauszufinden, wie sich eine VHS-Infektion auf Regenbogenforellen auswirkt, die nach Adaptation an eine bestimmte WT mit dem VHS-V infiziert und danach Temperaturveränderungen ausgesetzt wurden. 72 Regenbogenforellen wurden acht Wochen lang adaptiert, die eine Hälfte an 15°C die andere an 8°C. Danach erfolgte die Infektion über die Kiemen (Infektionstiter $7{,}8 \times 10^5$ PBE/ml) und eine nochmalige Aufteilung der Tiere in je zwei Gruppen, wie die Abbildung 3 zeigt.

Abb. 3: Wassertemperatur (WT) während der Adaptationszeit und nach durchgeführter VHS-Infektion



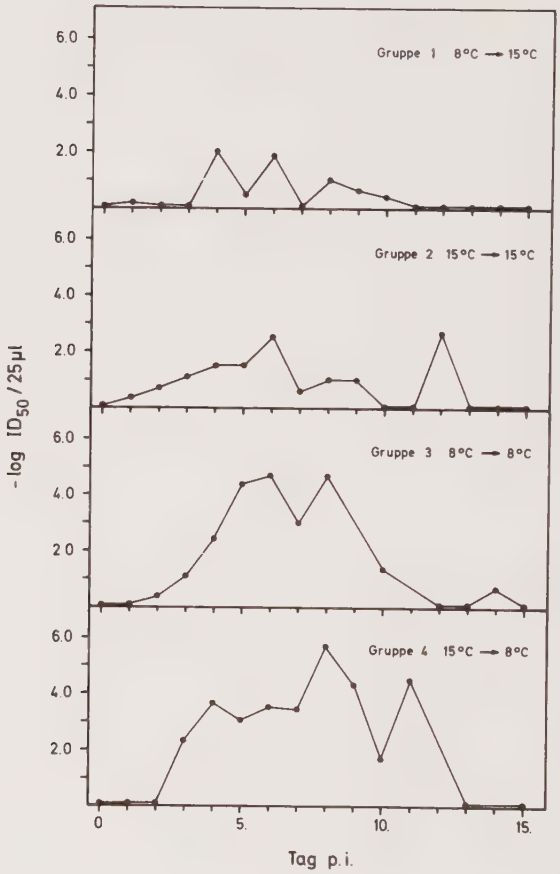
Untersucht wurden die Parameter: Inkubationszeit, Morbidität, Mortalität und Virusgehalt im Blutserum.

In Abbildung 4 sind die geometrischen Mittelwerte aus der Virustitration der Forellenseren in den einzelnen Versuchsgruppen dargestellt.

Die Fische der Gruppe 1 (8°C → 15°C) zeigten nur schwach ausgeprägte Krankheitssymptome wie geringe Dunkelfärbung, teilweise Anämie und petechiale Blutungen in den inneren Organen. Die Verluste, die zwischen dem 7. und 10. Tag p.i. zu verzeichnen waren, können mit 17% als gering eingestuft werden. Das Absinken des Virusgehalts bis zum 11. Tag p.i. ist auf zwei Gründe zurückzuführen: Einerseits entfallen bei der Mittelwertbildung die Seren der an der Krankheit verendeten Fische, andererseits war im Serum der überlebenden Forellen bei abklingender Infektion ein Rückgang des Virusgehalts zu beobachten. Diese Fische hatten sich bis zum 11. Tag p.i. erfolgreich mit dem Erreger auseinandergesetzt und die Infektion überstanden.

In der Gruppe 2 (15°C → 15°C) manifestierte sich die Krankheit. Die Mortalität betrug 44%. Die Ausfälle waren zwischen dem 5. und 13. Tag p.i. zu verzeichnen. Die Mortalitätsrate war in diesem Zeitraum weitgehend einheitlich. Die erkrankten Forellen zeigten teilweise Exophthalmus; bei den verendeten Fischen waren Anämie und Hämorrhagien in den inneren Organen regelmäßig zu beobachten. Im Gegensatz zu Gruppe 1 war hier vom 1. Tag p.i. an ein kontinuierlicher Anstieg des Virusgehalts im Serum zu verzeichnen, wobei bei einzelnen Tieren eine verlängerte Inkubationszeit beobachtet wurde. Dies erklärt den Gipfel in Abbildung 4 (Gruppe 2) am 13. Tag p.i.

Abb. 4: Virusgehalt im Serum der Regenbogenforellen in den Versuchsgruppen 1-4




Geometrische Mittelwerte aus der Virustitration der Forellenseren. Versuchsschema vgl. Abb. 3.

In Gruppe 3 (8°C → 8°C) verendeten 89% der Regenbogenforellen zwischen dem 6. und 12. Tag p.i. Die Krankheitssymptome entsprachen denen der akuten Phase (s. S. 5). Der Anstieg des Virusgehalts im Serum der Fische war ab dem 2. Tag p.i. gleichmäßig steil; der Virustiter erreichte am 6. Tag p.i. sein Maximum. In der Erholungsphase (ab dem 8. Tag p.i.) ist die Mittelwertbildung als problematisch anzusehen, da in einigen Fällen nur noch wenige Fische vorhanden waren.

Obwohl der VHS-V-Nachweis im Serum der Regenbogenforellen in Gruppe 4 (15°C → 8°C) erst ab dem 3. Tag p.i. möglich war, verlief die VHS-Infektion ähnlich der in Gruppe 3. Die Mortalität erreichte 72%. Auch hier zeigten die Fische die Symptome der akuten Phase. Die meisten Verluste traten zwischen dem 6. und 10. Tag p.i. auf. Ab dem 2. bis zum 4. Tag p.i. war ein sprunghafter Anstieg des Virustiters festzustellen. Das Maximum des Virustiters war in dieser Gruppe am 8. Tag p.i. erreicht.

Der Einfluß einer raschen Abkühlung der Wassertemperatur (WT) auf den Krankheitsverlauf nach einer VHS-Infektion

Die Ergebnisse des vorhergehenden Kapitels haben gezeigt, daß ein Absinken der WT einen starken Einfluß auf den Krankheitsverlauf einer VHS-Infektion der Forellen nimmt. Um das Krankheitsgeschehen während und kurz nach dem Absenken der WT am Einzeltier zu betrachten, wurde folgende Versuchsanordnung gewählt:

36 Regenbogenforellen aus den Hälteranlagen (WT 15°C) wurden über das Wasser mit VHS-V infiziert; der Virustiter betrug $8{,}8 \times 10^7$ PBE/ml. Anschließend wurden die Versuchstiere in zwei Großgruppen aufgeteilt. Die erste Großgruppe verblieb nach der Infektion bei der WT von 15°C. Bei den Fischen der zweiten Großgruppe wurde die WT innerhalb von 24 Std. auf 8°C gesenkt.

Um eine Korrelation zwischen WT und Infektionsverlauf erarbeiten zu können, mußten von den Fischen täglich Blutproben entnommen werden. Zur Vermeidung des täglichen Streßmomentes durch die Blutentnahme wurden die Fische des jeweiligen Temperaturbereichs in drei weitere Untergruppen unterteilt und mit Kiemendeckelmarken markiert.

Die Fische der Gruppe 1 wurden am 1., 4., 7. etc. Tag p.i., die Gruppe 2 am 2., 5., 8. etc. Tag p.i. und Gruppe 3 am 3., 6., 9. etc. Tag p.i. geblutet. So kam jeder Fisch nur an jedem dritten Tag zur Blutentnahme.

Untersucht wurden die Parameter: Inkubationszeit, Morbidität, Mortalität und Virusgehalt im Blutserum. Auf den Verlauf der VHS-V-Vermehrung im Serum der einzelnen Forellen während der Anfangsphase der Infektion wurde besonderen Wert gelegt.

Obwohl die Regenbogenforellen der ersten Großgruppe nach der Infektion weiterhin bei einer WT von 15°C gehalten wurden, manifestierte sich die Krankheit. Die Mortalität, verbunden mit den typischen VHS-Symptomen, betrug 55%.

Bei der Untersuchung der Virusvermehrung im Einzeltier (ausgewählte Tiere in Abb. 5) fiel auf, daß diejenigen Fische, bei denen der Virustiter schnell anstieg und -log $ID_{50}$ 5.0/25 µl erreichte, in der Regel an der Infektion zugrunde gingen. Bei den überlebenden Tieren sank der Virusgehalt wieder ab und war ab dem 13. Tag p.i. nicht mehr nachweisbar. Bei einigen Tieren der Gruppe 3 manifestierte sich die Krankheit erst sehr spät und verlief dann inapparent.

Der Infektionsverlauf in einer Forellenpopulation wird durch das Auftragen der geometrischen Mittelwerte aus den einzelnen Virustitern deutlich (Abb. 5).

In der Anfangsphase der Infektion war ein sehr steiler Anstieg des Virustiters zu beobachten. Bis zum 6. Tag p.i. gingen 33% der Forellen an der VHS zugrunde. Die Einschnitte im Kurvenverlauf der

Mittelwerte am 6. und 9. Tag p.i. sind darauf zurückzuführen, daß einerseits ein Teil der Fische nur einen geringen Virusgehalt aufwies und damit die Infektion überleben konnte, andererseits bei einzelnen Fischen die Inkubationszeit verlängert war und, damit verbunden, auch die Virusvermehrung später erfolgte (vgl. Abb. 5, Gruppe 3).

Bei den Forellen, die der Absenkung der WT ausgesetzt waren, traten hohe Verluste auf. Die Mortalität betrug insgesamt 88%. Interessanterweise war der Virusnachweis bei den Einzeltieren im Vergleich zur Großgruppe 1 erst einen Tag später möglich (vgl. Abb. 6). Zwischen dem 3. und 7. Tag p.i. war allgemein ein sehr steiler Anstieg des Virusgehalts zu beobachten. Am auffälligsten war dies in Gruppe 3, wo die Mortalität 100% erreichte. Nach dem "Temperatursturz" verendeten selbst die Fische (im Gegensatz zu den Fischen in Großgruppe 1), die einen relativ niedrigen Virustiter aufwiesen (um $-\log ID_{50}$ 3.0/25 µl). Lediglich die wenigen Tiere, die unter diesem Wert blieben, überlebten die Krankheit (vgl. Abb. 6, Gruppe 2).

Vergleicht man die geometrischen Mittelwerte der beiden Großgruppen, so ist in der zweiten Gruppe klar zu erkennen, daß sich der Virusgehalt im Blut insgesamt bis zum 15. Tag p.i. auf einem höheren Niveau hielt. Zwischen dem 8. und 15. Tag p.i. traten hier die meisten Ausfälle auf.

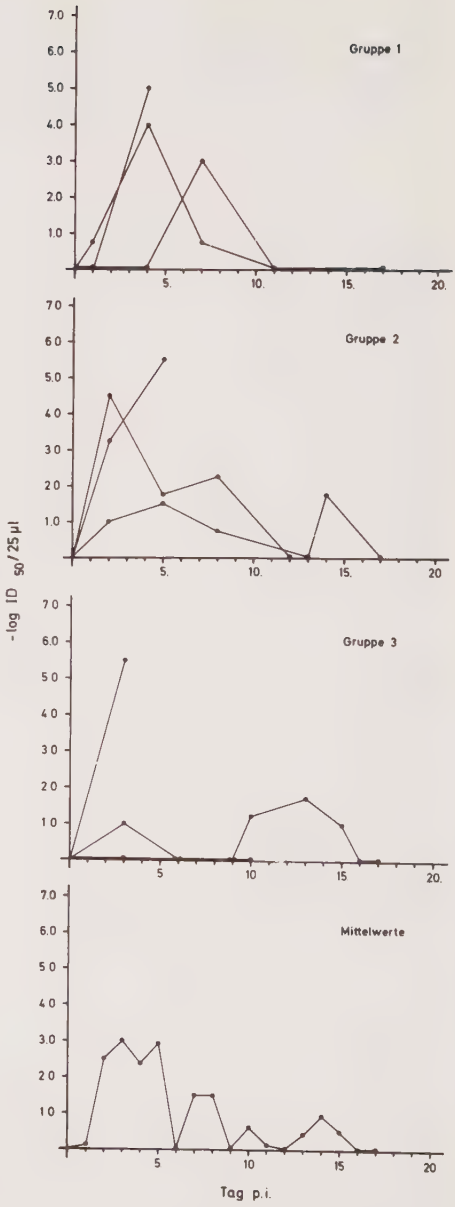
Abb. 5:

Verlauf der Virusvermehrung bei Regenbogenforellen, die nach der VHS-Infektion bei 15°C gehalten wurden

Gruppe 1-3: Virusgehalt im Serum von ausgewählten Tieren

Blutentnahme
Gruppe 1:
1., 4., 7. etc. Tag p.i.
Gruppe 2:
2., 5., 8. etc. Tag p.i.
Gruppe 3:
3., 6., 9. etc. Tag p.i.

Mittelwerte: Virusgehalt als geometrischer Mittelwert aller Versuchstiere



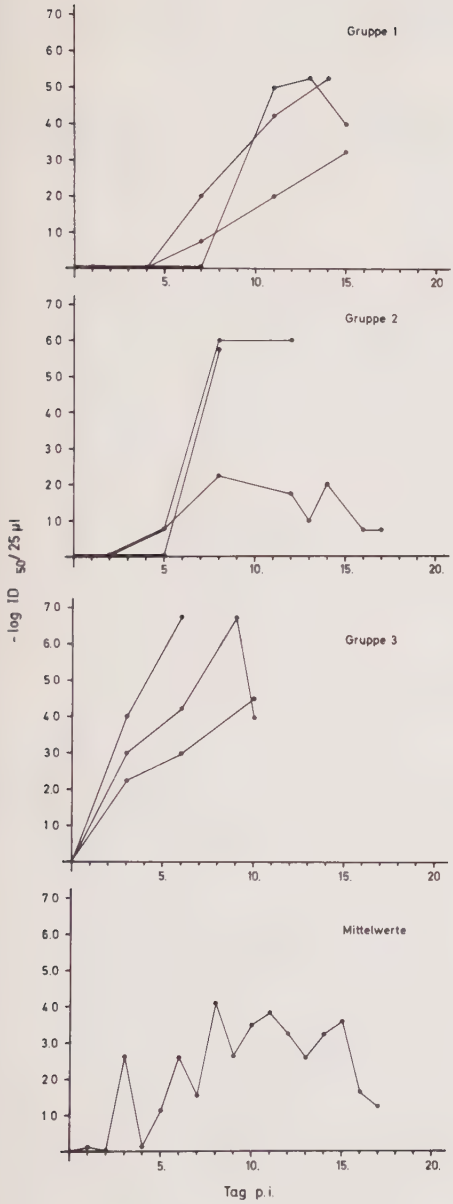



Abb. 6:

Verlauf der Virusvermehrung bei Regenbogenforellen, bei denen nach der VHS-Infektion die WT von 15°C auf 8°C rasch abgesenkt wurde

Gruppe 1 - 3: Virusgehalt im Serum von ausgewählten Tieren

Blutentnahme
Gruppe 1:
1., 4., 7. etc. Tag p.i.
Gruppe 2:
2., 5., 8. etc.Tag p.i.
Gruppe 3:
3., 6., 9. etc. Tag p.i.

Mittelwerte: Virusgehalt als geometrischer Mittelwert aller Versuchstiere

Verlauf einer VHS-Infektion bei andauernden Schwankungen der Wassertemperatur (WT)

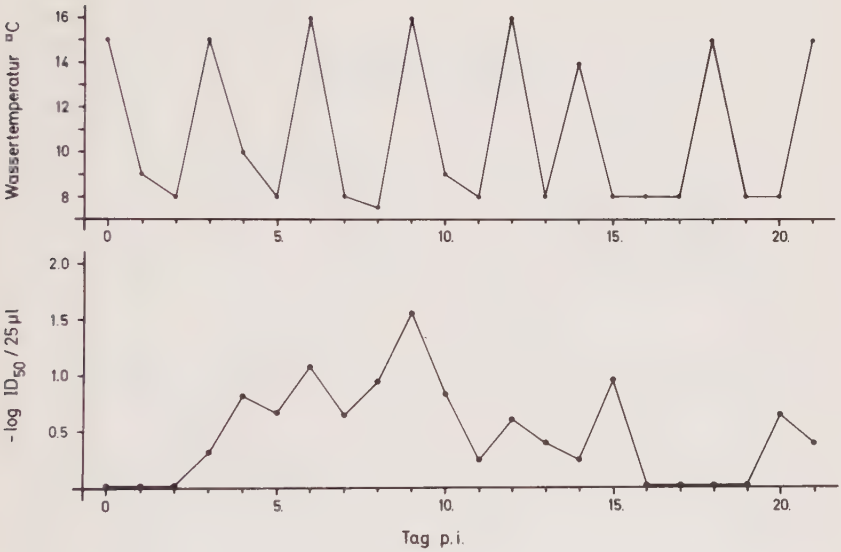
Es galt, in diesem Teilversuch herauszufinden, ob Schwankungen der WT zwischen 15°C und 8°C über einen längeren Zeitraum hinweg den Krankheitsverlauf nach einer VHS-Infektion verstärkend beeinflussen können.

18 Regenbogenforellen aus den Hälteranlagen wurden über das Wasser mit VHS-V infiziert; der Infektionstiter betrug $8{,}8 \times 10^7$ PBE/ml. Nach der Infektion wurden die Fische andauernden Schwankungen der WT, wie sie in Abbildung 7 wiedergegeben sind, ausgesetzt. Untersucht wurden wieder die Parameter Morbidität, Mortalität und Virusgehalt im Serum. Auf eine Darstellung der Einzelwerte wurde dabei verzichtet, angeführt sind die Werte des geometrischen Mittels.

Die Infektion manifestierte sich in dieser Versuchsanordnung nur schwach. Die moribunden Fische zeigten zwischen dem 6. und 10. Tag p.i. Dunkelfärbung, teilweise schwach ausgeprägten Exophthalmus und geringgradige Anämie.

Die Mortalität in ihrer Gesamtheit betrug annähernd 39%, wobei die ersten Verluste zwischen dem 6. und 12. Tag p.i. (16,6%), die übrigen Ausfälle zwischen dem 15. und 16. Tag p.i. (22,2%) zu verzeichnen waren. Zu dieser Zeit war auch ein wiederholter Anstieg des Virusgehalts im Serum zu beobachten. Aus den Einzelwerten war jedoch ersichtlich, daß die Inkubationszeit der Fische, die am 15. und 16. Tag p.i. verendeten, verlängert war. Der Anstieg des Virustiters ab dem 19. Tag p.i. war hingegen auf eine Übertragung der bis dahin virusfreien Forellen zurückzuführen; jedoch verlief die Infektion bei diesen Fischen inapparent. Bis zum Versuchsabschluß zeigten diese Forellen keine Symptome einer Erkrankung. Auch hatte der Virustiter sein Maximum am 20. Tag p.i. schon überschritten.

Abb. 7: Verlauf der Virusvermehrung in Regenbogenforellen, die andauernden Schwankungen der WT ausgesetzt waren




Geometrische Mittelwerte der Virustitration im Serum von Regenbogenforellen in Korrelation zur WT

B) Zur Problematik von apparent und inapparent verlaufenden VHS-Infektionen

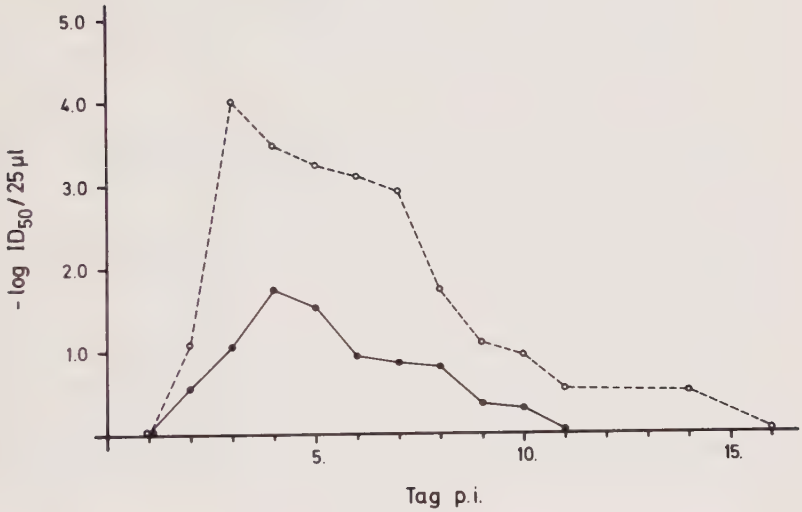
Vergleich einer apparent und einer inapparent verlaufenden VHS-Infektion

Betrachtet man die Gesamtheit der durchgeführten Versuche, so kann man beobachten, daß es trotz übereinstimmender Versuchsbedingungen (jeweils dieselbe WT, tägliche Reinigung der Versuchsanlagen, derselbe Infektionsmodus etc.) zu apparenten, aber auch verschiedentlich zu weitgehend inapparenten Infektionsverläufen kam. Infolgedessen soll hier eine vergleichende Auswertung von akut verlaufenden Infektionsversuchen mit inapparent gebliebenen durchgeführt werden.

Mehrere Vergleichsgruppen, die bei einer WT von 12°C gehalten wurden, gestatteten Vergleiche bezüglich Morbidität, Mortalität und Virusgehalt im Blut.

Bei einer akuten Infektion, verbunden mit einer hohen Verlustrate, stieg der Virusgehalt im Serum steil an. Der Virustiter hielt sich über einen längeren Zeitraum hinweg (4. - 8. Tag p.i.), im Unterschied zur inapparenten Infektion, auf einem relativ hohen Niveau (vgl. Abb. 8). Ausfälle gab es ab dem 7. Tag p.i. Interessanterweise verendeten auch solche Fische, deren Virustiter im Serum wieder rückläufig waren (siehe auch Abb. 6, Gruppe 1 und 3). Bis zum 15. Tag p.i. waren 75% der Versuchstiere mit deutlichen VHS-Symptomen verendet.

Abb. 8: Vergleich der Virustitration im Serum bei einer apparent und einer inapparent verlaufenden VHS-Infektion




Geometrische Mittelwerte der Virustitration im Serum von Regenbogenforellen

o- - - -o apparente VHS-Infektion

●——● inapparente VHS-Infektion

Bei der inapparent verlaufenden VHS-Infektion stieg der Virusgehalt im Serum im Vergleich weniger steil an. Die Fische zeigten nur schwach ausgeprägte VHS-Symptome. Lediglich zwischen dem 3. und 8. Tag p.i. waren einzelne Verluste zu verzeichnen (14,3%). Die Mehrzahl der Forellen konnte sich mit dem Ag auseinandersetzen und die Infektion überstehen. Dies wird durch das kontinuierliche Absinken des Virustiters deutlich (vgl. Abb. 8). Ab dem 11. Tag p.i. war kein Virus mehr nachweisbar.

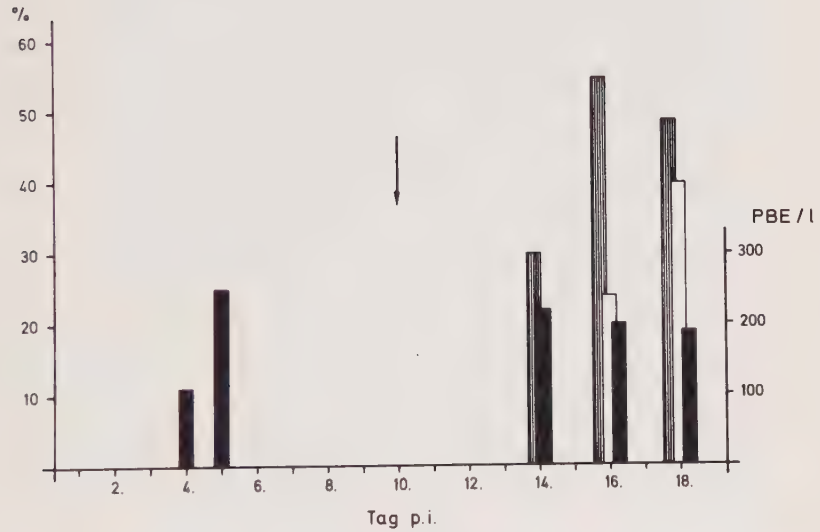
Induktion einer akuten VHS aus einer inapparenten VHS-Infektion durch Verschlechterung der Umweltbedingungen

Untersucht wurde, ob durch weitere abiotische Faktoren (neben dem Einfluß der WT) eine akute VHS ausgelöst werden kann. 20 Regenbogenforellen wurden bei einer WT von 8°C i.p. mit VHS-V infiziert; der Infektionstiter betrug $2{,}5 \times 10^7$ PBE/ml. Am 10. Tag p.i. wurde der Filterkreislauf der Versuchsanlage unterbrochen. Damit häuften sich die Stoffwechselprodukte der Fische im Wasser an. Die Wasserqualität verschlechterte sich, ohne für die Fische toxische Werte zu erreichen.

Die Abbildung 9 verdeutlicht den Verlauf der zunächst inapparent verlaufenden VHS-Infektion. Die Forellen zeigten bis zum 10. Tag p.i. keinerlei Anzeichen einer Erkrankung, und im Wasser konnte lediglich am 4. und 5. Tag p.i. VHS-V festgestellt werden.

Nach der Unterbrechung des Filterkreislaufes der Versuchsanlage am 10. Tag p.i. manifestierte sich die Krankheit mit einer Verzögerung von wenigen Tagen. Die Mortalität, mit typischen VHS-Symptomen verbunden, stieg bis zum 18. Tag p.i. auf 40% an (vgl. Abb. 9).

Abb. 9: Induktion einer akuten VHS aus einer inapparenten VHS-Infektion




Die Unterbrechung des Filterkreislaufes verschlechterte die Wasserqualität. Mit einer Verzögerung von vier Tagen manifestierte sich die VHS-Infektion.

Morbidität
Mortalität
Virusgehalt im Wasser
Unterbrechung des Filterkreislaufes

Vergleich der VHS-V-Isolierung aus dem Plasma und den Blutzellen und die Auswirkung auf den Krankheitsverlauf

Lehmann und Stürenberg (1975), Deufel und Pöllnitz (1977), Hoffmann et al. (1979) und Amlacher et al. (1982) beschreiben pathologische Veränderungen der Erythrozyten und Granulozyten bei einer VHS-Infektion. Bei den Granulozyten werden Deformationen gefunden, bei den Erythrozyten Anzeichen einer Lyse. In den Lymphozyten chronisch-infizierter Forellen gelingt der Nachweis von VHS-V (Enzmann, 1983).

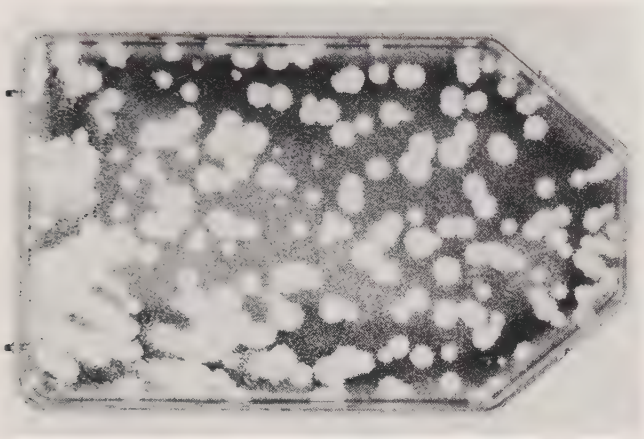
Bei einem Vergleich der VHS-V-Isolierung aus dem Plasma und den Blutzellen VHS-infizierter Regenbogenforellen ergab sich im Hinblick auf den Krankheitsverlauf der VHS eine interessante Beobachtung.

Zwei Regenbogenforellen (Nr. 599, 850) wurden über das Wasser mit VHS-V infiziert; der Infektionstiter betrug $4{,}0 \times 10^5$ PBE/ml. Die erste Blutentnahme erfolgte 6 Std. p.i., die zweite 22 Std., die dritte 31 Std. p.i. Ab der 48. Std. p.i. erfolgte die Blutentnahme im täglichen Rhythmus. Pro Blutentnahme wurden 0,5 ml Blut in einem gleichen Volumen Alsever aufgenommen, um somit die Blutgerinnung zu verhindern.

Die Blutzellen wurden durch Zentrifugation (800 x g, 10 Min., 4°C) vom Plasma getrennt und anschließend nochmals mit Medium gewaschen und danach in 1 ml Medium (MEM-Hepes + 10% FKS-Zusatz) resuspendiert. Jeweils 1 ml Plasma bzw. Blutzellen wurden auf konfluenten Zellkulturen eine Stunde lang bei 20°C inkubiert. Danach wurde das Inokulum abgezogen und der Zellrasen mit 10 ml Plaque-Medium (s. S. 100) überschichtet. Nach siebentägiger Bebrütungszeit wurden die bis dahin gebildeten Plaques ausgezählt.

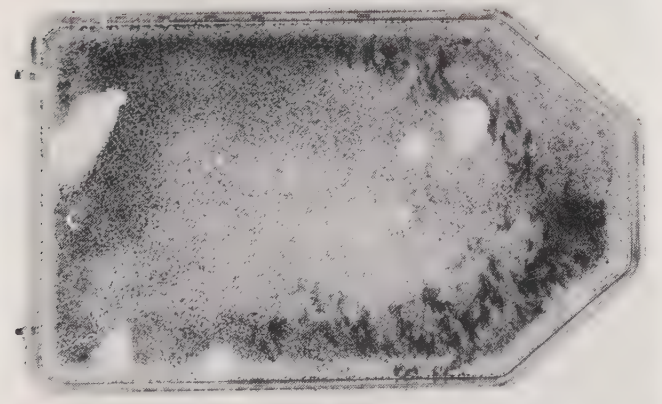
In den Abbildungen 10 und 11 ist der fixierte und gefärbte Zellrasen der mit Plasma bzw. mit Blutzellen infizierten Kulturen der Forelle Nr. 599 am 11. Tag p.i. gezeigt. In Abbildung 10 sind deutlich die Plaques zu erkennen, die durch das VHS-V-haltige Plasma verursacht wurden. Dagegen sind in den mit Blutzellen infizierten Kulturen nur wenige Plaques zu beobachten (vgl. Abb. 11).

Abb. 10: Plaque-Bildung nach Infektion mit Plasma der Forelle Nr.599 (11. Tag p.i.)



RTG-2-Zellen mit 1 ml Plasma infiziert, nach siebentägiger Bebrütungszeit (15°C) fixiert und mit Giemsa gefärbt

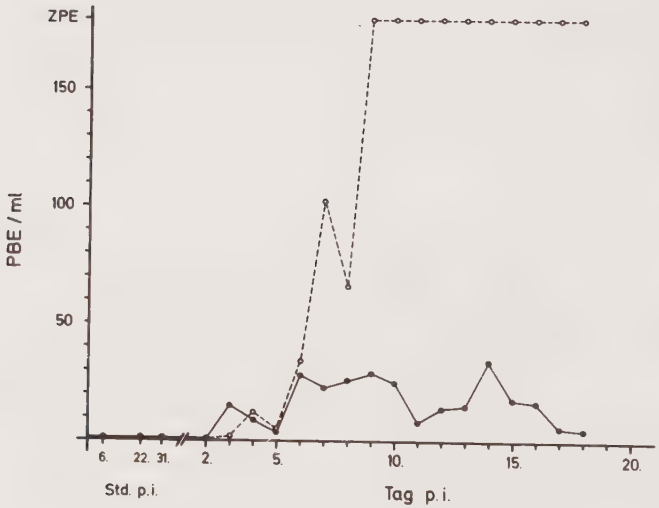
Abb. 11: Plaque-Bildung nach Infektion mit Blutzellen der Forelle Nr. 599 (11. Tag p.i.)



RTG-2-Zellen mit 1 ml Blutzellen in MEM-Medium infiziert, nach siebentägiger Bebrütungszeit (15°C) fixiert und mit Giemsa gefärbt.

Vergleicht man beim Fisch Nr. 599 die Zunahme der PBE im Plasma und in den Blutzellen, so war ein deutlicher Anstieg der PBE bis zum völligen ZPE des mit dem Plasma infizierten Zellrasens zu beobachten. Die VHS-V-Isolierung aus den Blutzellen fiel hingegen kaum ins Gewicht (vgl. Abb. 12). Der Fisch verendete am 18. Tag p.i. Makroskopisch waren die Kiemen und die inneren Organe blaß und es konnten Petechien in der Muskulatur sowie im Fettgewebe festgestellt werden.

Abb. 12: Virusnachweis im Plasma und in den Blutzellen der Forelle Nr. 599



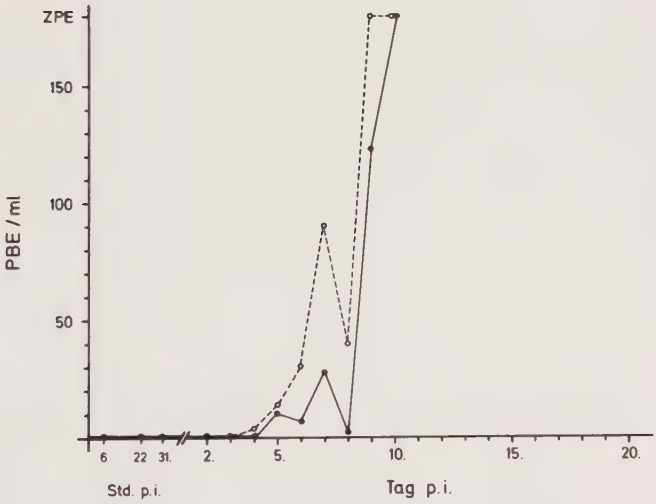

O----O VHS-V-Isolierung aus dem Plasma

●——● VHS-V-Isolierung aus den Blutzellen

Die Forelle verendete am 18. Tag p.i.

Die Abbildung 13 vermittelt die Zunahme der PBE im Plasma und in den Blutzellen des Fisches Nr. 850. Hier ist die Zahl der infizierten Blutzellen vergleichbar mit den Infektiositätstitern im Plasma. Der Fisch verendete bereits am 10. Tag p.i. Neben anderen typischen VHS-Symptomen fiel besonders eine hochgradige Anämie auf.

Abb. 13: Virusnachweis im Plasma und in den Blutzellen der Forelle Nr. 850




o---o VHS-V-Isolierung aus dem Plasma

●——● VHS-V-Isolierung aus den Blutzellen

Die Forelle verendete am 10 Tag p.i.

C) Die Antikörperbildung und der Immunstatus von Regenbogenforellen nach überstandener VHS-Infektion

Der Nachweis von Antikörpern (Ak) in Regenbogen- und Bachforellen nach überstandener VHS-Infektion

Die Ak-Bildung der Regenbogen- und Bachforellen gegen das VHS-V wurde bei Fischen untersucht, die eine inapparente VHS-Infektion überstanden hatten. Die Regenbogenforellen waren mit dem Virus über das Wasser infiziert worden (Infektionstiter $1{,}26 \times 10^7$ PBE/ml, WT 12°C, Infektionsmodus der Bachforellen s. S. 60). Der Krankheitsverlauf und die Virusvermehrung in den Regenbogenforellen können aus Abbildung 8, die Virusisolierung aus dem Serum der Bachforellen aus Tabelle 3 entnommen werden. Bis zum 304. Tag p.i. wurde den Versuchstieren einmal pro Woche 1 ml Blut entnommen (= 43 mal), anschließend bis zum 396. Tag p.i. im vierzehntägigen Rhythmus (= 13 mal). Nach Aufbereitung des Serums wurde es mittels der Gegenstrom-Immunelektrophorese (GIE) qualitativ auf Ak untersucht und die Spezifität der Immunpräzipitate der GIE mit der Radio-Immun-Präzipitation (RIP) stichprobenhaft überprüft. Die RIP hat freundlicherweise Herr Dr. Enzmann durchgeführt. In der Abbildung 14 sind einige Immunpräzipitate der GIE als Autoradiographie dargestellt.

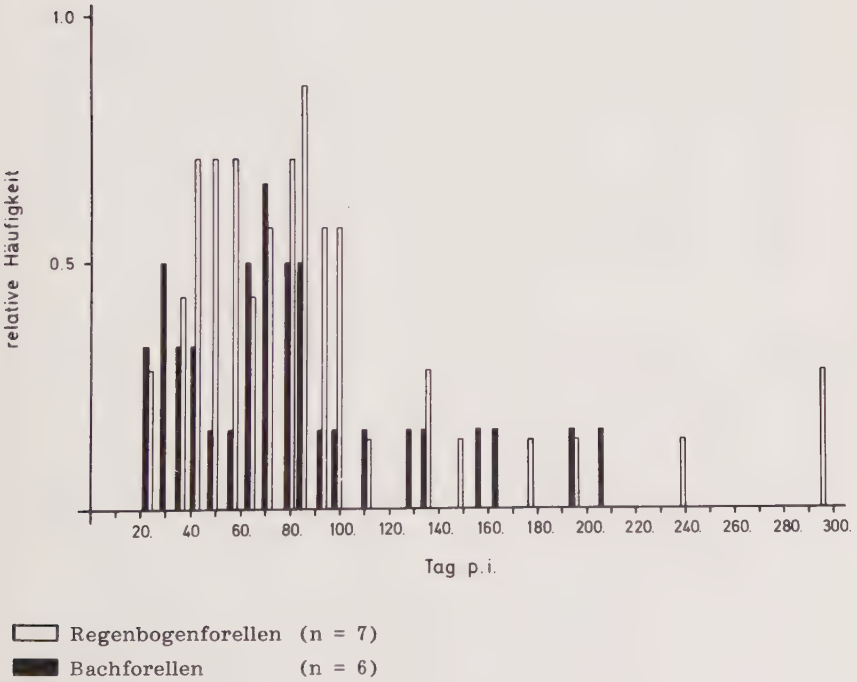
Abb. 14: Beispiele von VHS-antikörperpositiven Forellenseren in der Autoradiographie

(↑) antikörperpositive Forellenseren
Vergrößerung: x 2,25

Am 23. Tag p.i. waren im Serum von zwei Regenbogenforellen zum ersten Mal Ak nachweisbar. Bis zum 85. Tag p.i. waren in sechs von sieben untersuchten Regenbogenforellen Ak nachzuweisen. Dann allerdings war bis zum 111. Tag p.i. die Anzahl der Ak-positiven Fische stark rückläufig. Nach diesem Zeitpunkt war bis zum 296. Tag p.i. kein regelmäßiger, danach überhaupt kein Ak-Nachweis mehr möglich.

In Abbildung 15 ist die relative Häufigkeit der Ak-positiven Regenbogenforellen bis zum 300. Tag p.i. aufgezeigt. Zum Vergleich wurde in diese Abbildung die relative Häufigkeit der Ak-positiven Bachforellen, die ebenfalls mit VHS-V infiziert worden waren (s. S. 60), eingezeichnet.

Abb. 15: Relative Häufigkeit VHS-antikörperpositiver Regenbogen- und Bachforellen nach überstandener VHS-Infektion



Im Serum von zwei Bachforellen waren ebenfalls am 23. Tag p.i. Ak nachweisbar. Bis zum 71. Tag p.i. konnten in vier von sechs Bachforellen, die sich mit dem Ag auseinandergesetzt hatten (vgl. Tab. 3) Ak nachgewiesen werden. Die rasche Abnahme der Ak-positiven Bachforellen vom 85. Tag p.i. bis zum 93. Tag p.i. ist damit zu erklären, daß in diesem Zeitraum die Bachforellen bis auf ein Exemplar verendeten. In der letzten Forelle waren bis zu ihrem Tode am 206. Tag p.i. Ak nachzuweisen.

In der RIP und in den Immunpräzipitaten der GIE konnten die viralen Strukturproteine nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß die Regenbogen- und Bachforellen Ak gegen diese Proteine gebildet hatten.

Reinfektion von Regenbogenforellen nach überstandener VHS-Infektion

Um der Frage nachzugehen, ob Regenbogenforellen, die eine VHS-Infektion überlebten, eine lang anhaltende Immunität besitzen, oder ob eine Reinfektion mit dem VHS-V die Fische erneut schädigt, wurden die im vorhergehenden Kapitel genannten überlebenden Fische am 396. Tag p.i. reinfiziert. Dies betraf vier Regenbogenforellen. Zwei der Tiere (Nr. 13, 20) waren mit dem VHS-V zu Versuchsbeginn infiziert worden, die beiden anderen Fische waren drei Tage später als nicht infizierte Kontrolltiere zugesetzt worden.

Bis zur 34. Woche p.i. konnten in allen Fischen Ak nachgewiesen werden. Die Reinfektion erfolgte über die Kiemenvene; der Infektionstiter betrug $1{,}7 \times 10^8$ PBE/ml.

Da die Forellen im obengenannten Versuchszeitraum auf ein Körpergewicht von ca. 1000 bis 1500 g abgewachsen waren, konnte ihnen vom 397. Tag p.i. bis zum 416. Tag p.i. täglich Blut entnommen werden.

Im Serum der Fische war zwischen dem 398. Tag p.i. und dem 401. Tag p.i. (d.h. zwischen dem 2. und 5. Tag post reinfectionem) nur eine geringe Virusvermehrung nachzuweisen (Forelle Nr. 20: Max. Virustiter -log $ID_{50}$ 2.3/25 µl am 400. Tag p.i.).

Am 419. Tag p.i. (entspricht dem 23. Tag nach der Reinfektion) verendete die Forelle Nr. 13. Als Obduktionsbefund konnte lediglich eine Enteritis festgestellt werden.

Am 444. Tag p.i. (48. Tag nach der Reinfektion) wurde die Forelle Nr. 20 getötet, da sie ein für die Drehform der VHS typisches Schwimmverhalten zeigte. Als Obduktionsbefund konnte in der Schädelkapsel vermehrt Liquor cerebrospinalis festgestellt werden. Die übrigen Organe erschienen makroskopisch ohne pathologischen Befund. Auch eine Isolierung des Virus aus Kiemen, Thymusgewebe, Herz, Niere, Leber, Milz, Pylorus mit Pankreasgewebe und Gehirn gelang nicht. Mit Ausnahme des Gehirns zeigten diese Organe auch keine histopathologischen Veränderungen. Im Diencephalon dieses Tieres waren in einem Bereich Veränderungen anzutreffen, die für einen beginnenden Gewebszerfall sprechen (Karyopyknose und Karyorrhexis). Außerdem fand sich eine nichteitrige Meningitis.

Die restlichen Forellen zeigten bis zum Abschluß des Beobachtungszeitraumes keine Anzeichen einer erneuten Erkrankung.

Abb. 16: Karyorrhexis im Diencephalon der Regenbogenforelle Nr. 20 (H.-E.-Färbung; x 500)

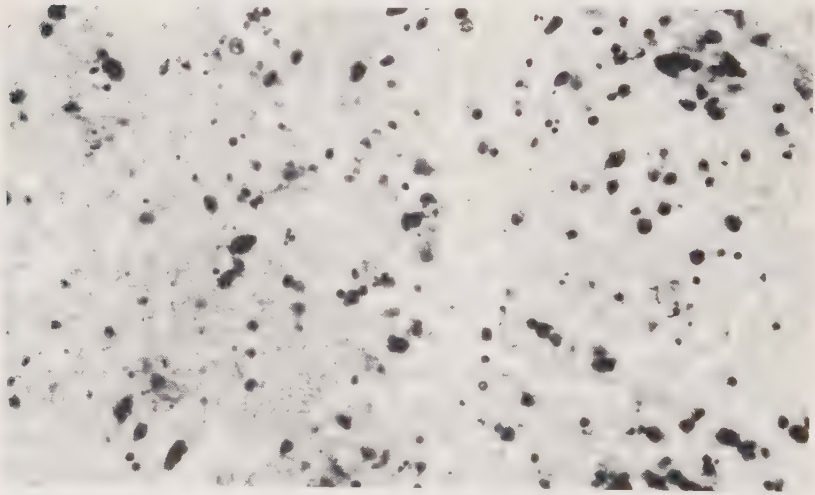
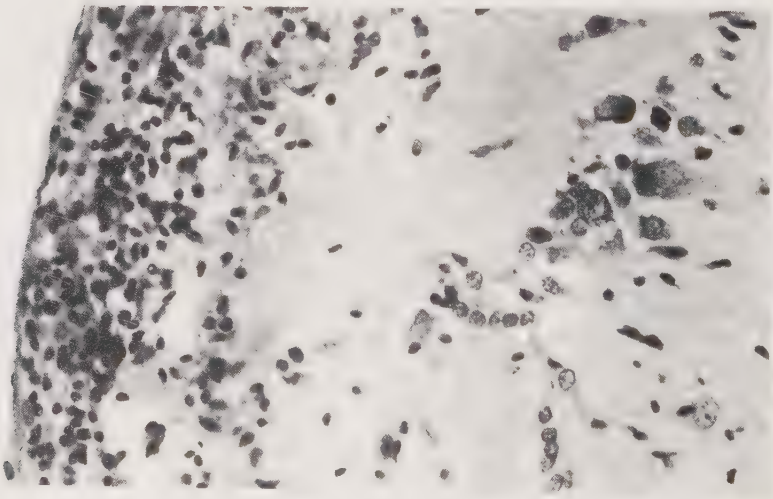


Abb. 17: Meningitis non purulenta im Diencephalon der Regenbogenforelle Nr. 20 (H.-E.-Färbung; x 500)



D) Epidemiologische Untersuchungen zur VHS in einem "Wildfischgewässer"

Im Frühjahr 1983 trat in Süd-Württemberg in den Forellenteichwirtschaften vermehrt die virale hämorrhagische Septikämie auf, was zu der Frage führte, ob die Ausbrüche durch eine Neueinschleppung des VHS-V verursacht wurden oder ob der Erreger in den betreffenden Gebieten endemisch ist. Für die Endemie spräche die Anwesenheit von Ak gegen das VHS-V im Wildfischbestand derjenigen Gewässer, die die VHS-betroffenen Forellenteichwirtschaften speisen.

An einem Gewässer, das als Modellsystem für eine epidemiologische Studie geeignet war, wurden zunächst folgende Problemstellungen untersucht:

a) Hat sich der Fischbestand im Bach selbst (hier Bachforellen) mit dem VHS-V auseinandergesetzt?
b) Wie ist die Verteilung von VHS-antikörperpositiven Fischen in der Gewässerstrecke?
c) Könnten weitere Fischarten als mögliche Überträger für das VHS-V auch im Wildfischgewässer dienen?

Da der Hecht als Besatzfisch in diesem Gewässersystem eine bedeutende Rolle spielt und, wie schon auf Seite 3 erwähnt, aus Hechtbrut VHS-V isoliert werden konnte, wurde er in die Untersuchung einbezogen und auf das Vorhandensein von spezifischen Ak untersucht. Im Labor wurden Bachforellen und Hechte mit VHS-V infiziert, um zu prüfen, inwieweit diese Spezies als Überträger der VHS in Betracht kommen.

Beschreibung des Gewässersystems

Drei Kilometer nach seinem Ursprung durchfließt der Bach drei Seen. Vierzehn Kilometer unterhalb der Seen befindet sich ein für Fische unüberwindbares Stauwehr, unterhalb dessen der erste Forellenzucht-

betrieb ($FZ_1$) an das Gewässer anraint. Weitere drei Kilometer flußabwärts liegt der zweite Forellenzuchtbetrieb ($FZ_2$). Neben diesen beiden gewerblichen Fischzuchtbetrieben (Haupterwerbsbetriebe) stehen die Teiche von 18 weiteren Nebenerwerbsbetrieben mit dem Gewässer in Verbindung. Abbildung 18 gibt den Verlauf des Gewässersystems schematisch wieder.

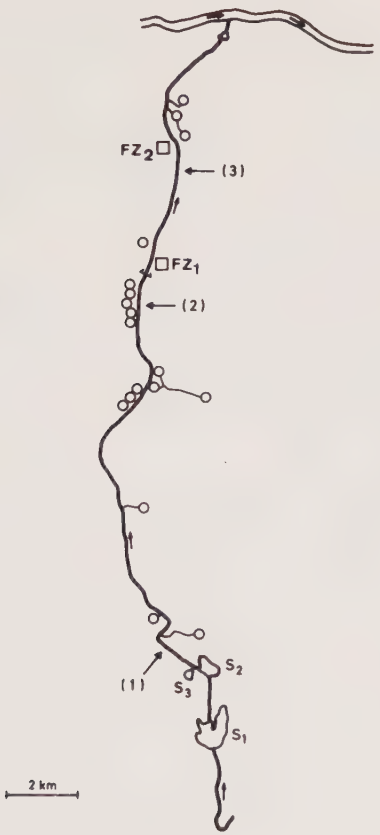
Die physiographischen, hydrologischen und geologischen Bedingungen sind stichwortartig in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die Angaben der Hydrologie beziehen sich auf die in Abbildung 18 markierten Stellen.

Die Seen werden für die Sportfischerei intensiv genutzt und dementsprechend auch bewirtschaftet. Jährlich werden eine größere Anzahl Hechte (Esox lucius L.), Karpfen (Cyprinus carpio L.), Schleien (Tinca tinca L.), und daneben eine kleinere Anzahl Welse (Silurus glanis L.) und Aale (Anguilla anguilla L.) eingesetzt. Die Pachtlose der Fließgewässerstrecke werden mit Bach- oder Regenbogenforellen besetzt.

Vorbericht und klinische Beobachtungen

Die epidemiologischen Untersuchungen wurden an demselben Gewässer durchgeführt, an dem die zwei Forellenzuchtbetriebe anrainen, die auf Seite 26 beschrieben sind. Der Vorbericht kann daher dort entnommen werden.

Abb. 18: Schematischer Verlauf des Gewässersystems




Hydrologische Verhältnisse wie in Tab. 1 angegeben

See in Flußrichtung ($S_1$, $S_2$, $S_3$)

Haupterwerbsbetrieb

Nebenerwerbsbetrieb

Stauwehr

Flußrichtung

Tab. 1: Physiographische, hydrologische und geologische Verhältnisse des Gewässers

| Geographische Lage | Hydrologie | Geologie | Morphologie | Licht |
|---|---|---|---|---|
| Quelle:<br>755m ü. NN<br><br>Mündung:<br>575m ü. NN<br><br>Fließrichtung:<br>NNW | Flußlänge:<br>28 km<br><br>Höhenunterschied:<br>180 m<br><br>mittleres Gesamtgefälle:<br>6,4‰<br><br>$F_N$:<br>152 $km^2$<br><br>Wasserabfluß Q. (3)<br>9.11.1983: 380 l/sek.<br>25.10.1984: 350 l/sek.<br>13.11.1985: 315 l/sek.<br><br>Gewässergüteklasse:<br>II<br><br>Wasserfläche der Seen:<br>See 1: 72 ha<br>See 2: 22 ha<br>See 3: 6 ha | Das Einzugsgebiet des Gewässers liegt auf der Grundmoräne der Rißeiszeit | mittlere Breite:<br>(1): 2,2 m<br>(2): 2,6 m<br>(3): 5,1 m<br><br>mittlere Tiefe:<br>(1): 0,12 m<br>(2): 0,12 m<br>(3): 0,24 m<br><br>Profil:<br>(1)-(3): rechteckig<br><br>Sohle:<br>(1): Kiesgrund, teilweise Schlammablagerung<br>(2),(3): Kiesgrund<br><br>Ufer:<br>(1)-(3): Wiesenvegetation<br><br>Gewässerausbau:<br>Allgemein begradigt, Uferbefestigung teilweise mit Holzbuhnen | gute Lichtverhältnisse herrschen vor |

## Arbeitsplan

Zu Beginn der jeweiligen Laichzeiten der Bachforelle bzw. des Hechtes wurden die Fische der beiden Arten mit Hilfe der Elektrofischerei dem Gewässer an ausgewählten Stellen entnommen. Die erste Bachforellenabfischung erfolgte sechs Monate nach dem ersten Seuchenzug in den anliegenden Teichwirtschaften. Die Ergebnisse dieser Abfischung veranlaßten dann, die Untersuchungen im darauffolgenden Jahr auf das gesamte Gewässer auszudehnen.

Die Abfischung der Hechte im Frühjahr 1984 erfolgte zunächst stichprobenartig in den Verbindungskanälen der Seen und im Uferbereich des dritten Sees ($S_3$ in Abb. 18). Im Frühjahr 1985 konnte die Hecht-Abfischung auf alle Uferbereiche der Seen ausgedehnt werden. In Abbildung 19 sind alle Probenentnahmestellen der Jahre 1983-1985 eingezeichnet.

Die Probenentnahmestellen sind aus technischen Gründen entgegen der Fließrichtung des Gewässers aufgeführt.

Dabei liegt

Probenentnahmestelle Nr. 1: 300 m unterhalb $FZ_2$
Probenentnahmestelle Nr. 2: 2,0 km flußabwärts von $FZ_1$, d.h. 1,0 km oberhalb von $FZ_2$
Probenentnahmestelle Nr. 3: unmittelbar unterhalb des Auslaufs von $FZ_1$

Die Probenentnahmestellen Nr. 4-7 befinden sich flußaufwärts von $FZ_1$ in folgenden Abständen:

Probenentnahmestelle Nr. 4: 2,0 km
Probenentnahmestelle Nr. 5: 4,5 km
Probenentnahmestelle Nr. 6: 7,0 km
Probenentnahmestelle Nr. 7: 13,5 km

Das Körpergewicht der gefangenen Bachforellen betrug 200 bis 500 g, das der Hechte 200 bis 1500 g. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Schwanzvene.

Der Ak-Nachweis in den jeweiligen Seren wurde mittels
der IF (s. S. 20)
der GIE (s. S. 21)
und des Serumneutralisationstests (s. S. 23) durchgeführt.

Abb. 19: Probenentnahmestellen der Jahre 1983 - 85

Probenentnahmestellen 1983/84

Probenentnahmestellen 1984/85

See

Haupterwerbsbetrieb

Nebenerwerbsbetrieb

Stauwehr

Flußrichtung

Ergebnisse der Felduntersuchungen

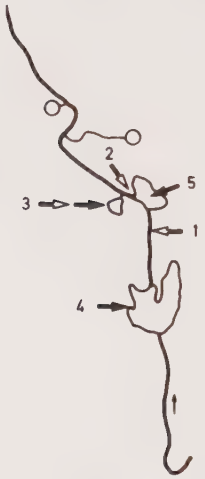
In Tabelle 2 und Abbildung 20 ist die Anzahl der getesteten und der VHS-antikörperpositiven Seren der Bachforellen bzw. Hechte aufgeführt. Für den besseren Überblick werden die Probenentnahmestellen der Hechte in Abbildung 20 nochmals aufgeführt.

Bedingt durch die verschieden hohe Populationsdichte der Bachforellen im Bach und bedingt durch den eingeschränkten Fangeffekt des Elektrofischereigerätes im See, war es nicht möglich, die Anzahl der gefangenen Fische konstant zu halten.

Tab. 2: VHS-antikörperpositive Bachforellen

| Probenentnahmestelle | | Anzahl der untersuchten Fische | | Anzahl der Seren mit VHS-Antikörpern | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1983/84 | 1984/85 | 1983/84 | 1984/85 | 1983/84 | 1984/85 |
| 1 | 1 | 24 | 33 | 10 | 22 |
| 2 | 2 | 29 | 26 | 3 | 10 |
| 3 | 3 | 29 | 28 | 11 | 17 |
| 4 | 4 | 28 | 30 | 6 | 8 |
| | 5 | | 31 | | 9 |
| | 6 | | 18 | | 6 |
| | 7 | | 12 | | 5 |

Abb. 20: VHS-antikörperpositive Hechte




| Probenentnahmestelle | | Anzahl der untersuchten Fische | | Anzahl der Seren mit VHS-Antikörpern | |
|---|---|---|---|---|---|
| 1983/84 | 1984/85 | 1983/84 | 1984/85 | 1983/84 | 1984/85 |
| 1 | | 1 | | 0 | |
| 2 | | 5 | | 1 | |
| 3 | 3 | 7 | 15 | 3 | 6 |
| | 4 | | 16 | | 5 |
| | 5 | | 2 | | 0 |

Probenentnahmestellen 1983/84

Probenentnahmestellen 1984/85

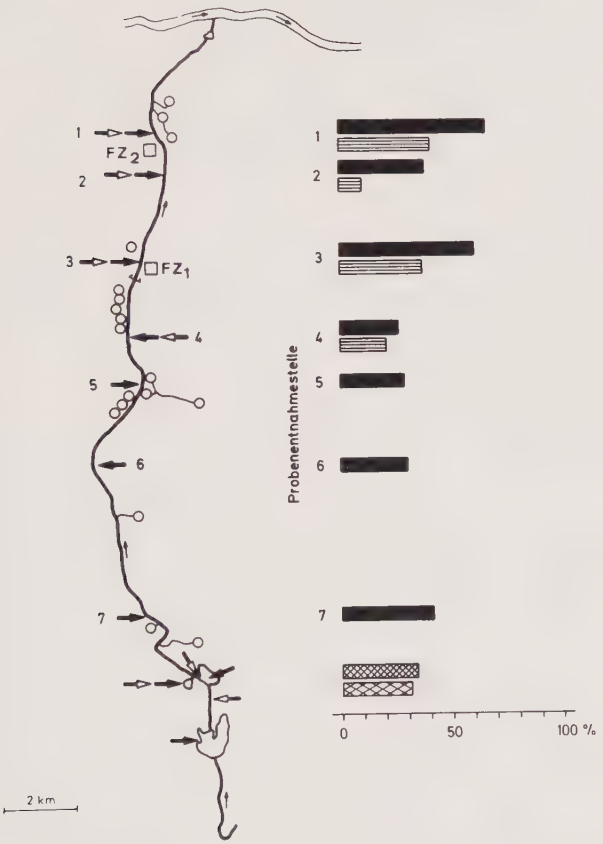
See

Nebenerwerbsbetrieb

Flußrichtung

In Abbildung 21 ist die prozentuale Verteilung der VHS-antikörperpositiven Bachforellen in der untersuchten Gewässerstrecke dargestellt. Für die Hechte ist der prozentuale Anteil der VHS-antikörperpositiven Fische für die Seen insgesamt angegeben.

Abb. 21: Prozentuale Verteilung von VHS-antikörperpositiven Bachforellen (BF) und Hechten im Untersuchungszeitraum 1983-85




BF-Abfischung 1983/84
BF-Abfischung 1984/85
Prozentualer Anteil von VHS-antikörperpositiven Hechten in allen Seen
1983/84
1984/85
Probenentnahmestellen 1983/84
Probenentnahmestellen 1984/85
See
Haupterwerbsbetrieb
Nebenerwerbsbetrieb
Stauwehr
Flußrichtung

Experimentelle VHS-Infektion bei der Bachforelle (Salmo trutta fario L.)

Für die Epidemiologie der VHS ist die Frage nach ihren Überträgern wichtig. Nach bisherigen Erkenntnissen ist der Serotyp $F_1$ für die Bachforelle nicht pathogen (s. S. 3). Allerdings gibt es auch keine eindeutigen Untersuchungen darüber, ob und inwieweit sich diese Fischart dennoch mit dem Ag auseinandersetzt, dabei Ak produziert bzw. als möglicher Überträger oder als Reservoir für die Krankheit in Frage kommt.

Da die auf Seite 57 beschriebenen Beobachtungen jedoch darauf hinweisen, daß der Bachforelle auch eine gewisse Bedeutung bei der Übertragung des Serotyps $F_1$ zukommen kann, wurde hier experimentell geprüft, ob die Ak-Produktion auf eine vorausgegangene Infektion mit diesem Serotyp zurückzuführen ist.

Acht Bachforellen, die aus einer Wildfischpopulation stammten, wurden über die Kiemen mit dem Feldisolat FI 13 infiziert, das aus den Forellen der $FZ_1$ im Jahr 1983 gewonnen wurde. Der Infektionstiter betrug $1{,}2 \times 10^7$ PBE/ml. Die Tiere wurden bei einer konstanten Wassertemperatur von 12°C gehalten und bis zum 11. Tag p.i. an jedem dritten Tag geblutet. Danach erfolgte die Blutentnahme wöchentlich bis zum Exitus der einzelnen Fische.

Die VHS-Infektion der Bachforellen entsprach meist einem inapparenten Krankheitsverlauf. Lediglich zwischen dem 3. und 7. Tag p.i. konnte eine Dunkelfärbung der Fische beobachtet werden; eine Bachforelle zeigte zwischen dem 6. und 19. Tag p.i. Symptome einer Anämie. Die Virusisolierung aus dem Blut gelang bei sechs Bachforellen nur am 3. und 5. Tag p.i.; Verluste, die auf VHS zurückzuführen waren, traten nicht auf.

Tab. 3: VHS-V-Isolierung aus dem Serum von Bachforellen (BF, -log $ID_{50}$/25 µl)

| Tag p.i. | 1. | 3. | 5. | 7. | 9. | 11. |
|---|---|---|---|---|---|---|
| BF-Nr. 1 | 0 | 1,50 | 1,50 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 3 | 0 | 2,25 | 1,50 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 0 | 1,75 | 1,50 | 0 | 0 | 0 |
| 5 | 0 | 1,50 | 1,50 | 0 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 1,50 | 1,50 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 8 | 0 | 2,00 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Am 23. Tag p.i. konnten mit der GIE bei den ersten Bachforellen Ak nachgewiesen werden. Die Ak-Bildung bei den Bachforellen ist der Abbildung 15 zu entnehmen.

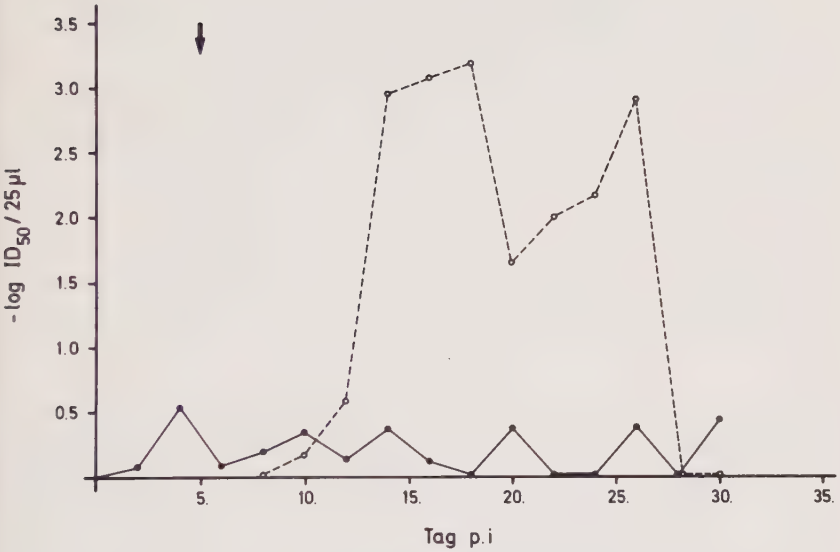
In einem weiteren Versuch wurde die Möglichkeit der Übertragung des VHS-V von der Bachforelle auf die Regenbogenforelle überprüft. Neun Bachforellen wurden über das Wasser (Infektionstiter $3{,}99 \times 10^5$ PBE/ml), weitere acht Bachforellen über die Kiemen infiziert (Infektionstiter $1{,}26 \times 10^7$ PBE/ml). Fünf Tage nach Versuchsbeginn wurden 27 Regenbogenforellen zu den Bachforellen in die Versuchsanlage gesetzt. Allen Tieren wurde jeden 2. Tag 0,5 ml Blut entnommen und das Serum auf seinen Virusgehalt geprüft.

Die VHS-Infektion verlief bei den Bachforellen, wie im vorherigen Versuch, inapparent. Zeitweise konnte bei einigen Bachforellen eine Aufhellung des Blutes beobachtet werden; im übrigen verlief die Infektion ohne weitere Symptome. Dagegen manifestierte sich die VHS in der Regenbogenforellen-Population. Dreizehn Tage nach Versuchsbeginn, d.h. sieben Tage nach der Übertragung des Virus von den Bachforellen auf die Regenbogenforellen (vgl. Abb. 22),

zeigten die ersten Regenbogenforellen Dunkelfärbung des Körpers sowie beginnenden Exophthalmus. Am 14. Tag nach Versuchsbeginn verendeten die ersten Regenbogenforellen mit deutlichen Symptomen der VHS. Neben den üblichen Hämorrhagien in den inneren Organen und der Muskulatur konnte eine hochgradige Anämie festgestellt werden. Bis zum 30. Tag nach Versuchsbeginn verendeten 66,6% der Regenbogenforellen an der Krankheit. Die Abbildung 22 zeigt den Virusgehalt im Blutserum der Bachforellen, sowie der später hinzugesetzten Regenbogenforellen. Aus dieser Abbildung wird deutlich, daß die Bachforellen das VHS-V auf die Regenbogenforellen übertragen hatten.

Die Überprüfung der Spezifität des isolierten VHS-V erfolgte mit der IF. Die mit dem Serum der Bach- und Regenbogenforellen infizierten RTG-2-Zellen zeigten eine gut abgegrenzte Immunfluoreszenz der infizierten Foci.

Abb. 22: Übertragung des VHS-V von der Bachforelle auf die Regenbogenforelle




Virustitration der Bachforellen- und Regenbogenforellen-Seren (geometrische Mittelwerte)

●——● Bachforellen

o- - -o Regenbogenforellen

——→ Regenbogenforellen in die Versuchsanlage zugesetzt

Experimentelle VHS-Infektion beim Hecht (Esox lucius L.)

Der hohe Prozentsatz an VHS-antikörperpositiven Hechten in den oben beschriebenen Seen führte zu der Frage, inwieweit der Hecht die VHS auf die Regenbogenforelle übertragen kann. Zur Prüfung wurden acht Hechte (s. S. 11) über die Kiemen und i.p. infiziert. Der Virustiter betrug $2{,}2 \times 10^7$ PBE/ml. Die Fische wurden anschließend in Aquarien einzeln gehältert und die WT innerhalb von 48 Std. von 15°C auf 8°C gesenkt.

Die Hechte Nr. 95, 93 und 94 verendeten mit unspezifischen Symptomen am 1. bzw. 2. Tag p.i. Am 5. Tag p.i. wurden den restlichen Hechten jeweils fünf Regenbogenforellen zugesetzt.

Den Hechten wurde alle zwei Tage bis zu ihrem Exitus, den Forellen ab dem 8. Tag nach Versuchsbeginn bis zum 20. Tag 0,5 ml Blut entnommen.

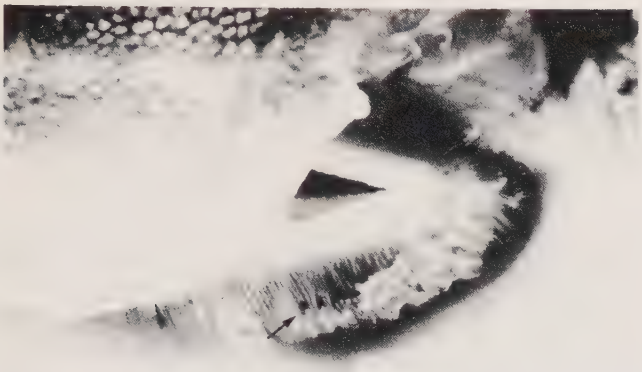
Den frisch verendeten Hechten wurden unter sterilen Bedingungen die Organe Kiemen, Herz, Niere, Milz und Leber entnommen, homogenisiert, und der Organüberstand wurde titriert (s. S. 16). Die Überprüfung der Virusspezifität erfolgte mittels der IF.

Die Krankheitssymptome bei den Hechten waren von verschieden starkem Ausmaß. Äußerlich waren in drei Fällen an den Flossenbasen von Brust- und Bauchflossen sowie der Afterflosse petechiale Blutungen zu sehen. Als Hauptbefund war in jedem Fall eine Anämie zu beobachten.

Die Kiemen waren blaß, und es traten Petechien auf (vgl. Abb. 23).

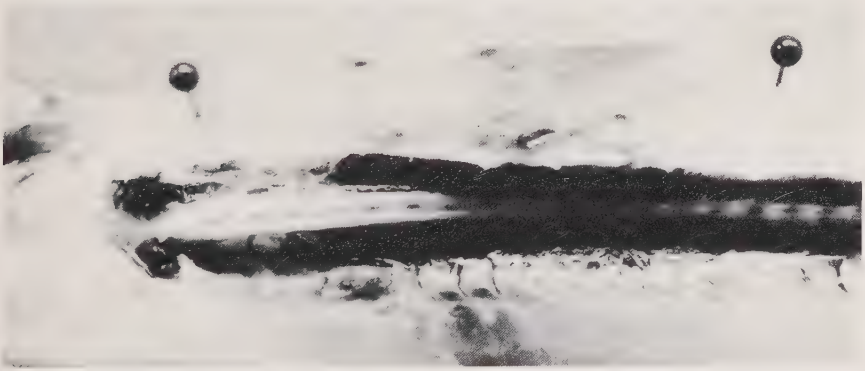
Die Niere wies im kranialen Bereich Veränderungen unterschiedlichen Grades auf, die bis zur Atrophie reichten. In diesen Fällen waren massive, paravaskuläre Blutungen in der benachbarten Muskulatur zu beobachten (Abb. 24).

Abb. 23: Kiemen eines mit VHS-V infizierten Hechtes



Die Kiemen erscheinen blutarm (Farbe hellrosa), vereinzelt sind Petechien zu erkennen (→). Vergrößerung: x 6,5.

Abb. 24: Niere eines mit VHS-V infizierten Hechtes



Die Niere ist im kranialen Bereich hämorrhagisch, teilweise ist eine Atrophie des Nierengewebes zu erkennen.
In der Muskulatur sind paravaskuläre Blutungen zu sehen. Vergrößerung: x 6,0.

Die übrigen inneren Organe zeigten sich lediglich anämisch. In Tabelle 4 ist die Virusisolierung aus den Organen Blut, Kiemen, Herz, Niere, Milz und Leber der Hechte am Tage ihres Exitus zusammengefaßt.

Tab. 4: VHS-V-Isolierung aus Hechtorganen am Tage des Exitus (-log $ID_{50}$/g Organgewebe)

| Tag p.i. | Nr. | Blut | Kiemen | Herz | Niere | Milz | Leber |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2. | 93 | n.u. | 4,25 | 4,75 | 4,39 | 4,80 | 3,25 |
| | 94 | n.u. | 4,11 | 3,30 | 4,70 | 5,61 | 3,51 |
| 6. | 89 | 5,21 | 4,06 | 3,56 | 4,75 | 4,61 | 3,61 |
| | 90 | 4,76 | 3,46 | 4,61 | 2,14 | 3,26 | 2,26 |
| | 96 | 8,85 | 3,50 | 5,22 | 4,30 | 5,67 | 4,06 |
| 10. | 92 | 4,91 | 5,25 | 6,25 | 5,39 | 6,05 | 4,75 |
| 12. | 91 | 6,85 | 4,00 | 6,50 | 6,39 | 6,39 | 4,75 |

Wie bei den Hechten, so verlief auch bei den später zugesetzten Regenbogenforellen die Krankheit verschieden stark. Bei allen Forellen war ein Virusnachweis möglich.

Die Krankheitssymptome entsprachen denen der akuten Phase. Als hauptsächlicher Befund konnte eine Anämie, teilweise verbunden mit Petechien bzw. Hämorrhagien in den inneren Organen und eine Atrophie der Niere beobachtet werden. Die Mortalität bei den Regenbogenforellen der einzelnen Gruppen betrug zwischen 40% und 80%.

In der Tabelle 5 sind die Virustiter, die aus dem Serum (25 µl) der Hechte und der Regenbogenforellen ermittelt wurden, zusammengefaßt.

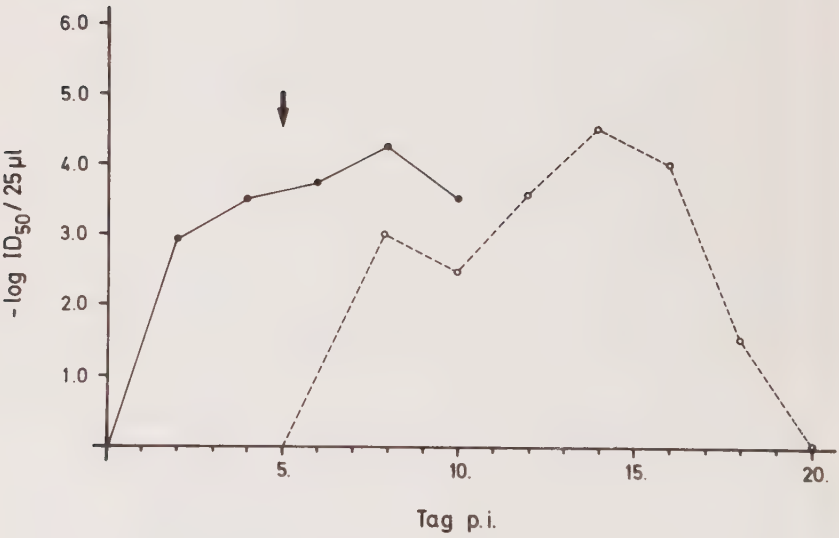
Tab. 5: VHS-V-Isolierung aus Hecht- und Regenbogenforellen-Serum

| Tag p.i. | Hecht Nr. | -log $ID_{50}$/ 25µl Serum | Forellen Nr. | -log $ID_{50}$/* 25µl Serum |
|---|---|---|---|---|
| 2. | 89 | 2,51 | | |
| | 90 | 1,50 | | |
| | 91 | 1,91 | | |
| | 92 | 2,91 | | |
| | 96 | 3,31 | | |
| 4. | 89 | 3,31 | | |
| | 90 | 2,71 | | |
| | 91 | 3,71 | | |
| | 92 | 3,51 | | |
| | 96 | 3,75 | | |
| 6. | 89 | 3,61 | | |
| | 90 | 3,16 | | |
| | 91 | 3,61 | | |
| | 92 | 3,76 | | |
| | 96 | 7,25 | | |
| 8. | | | 89 | 3,25 (5) |
| | | | 90 | 3,07 (5) |
| | 91 | 6,25 | 91 | 2,47 (5) |
| | 92 | 4,21 | 92 | 3,07 (5) |
| | | | 96 | 3,33 (5) |
| 10. | | | 89 | 2,80 (5) |
| | | | 90 | 2,11 (5) |
| | 91 | 3,31 | 91 | 2,29 (5) |
| | 92 | 3,46 | 92 | 2,43 (5) |
| | | | 96 | 2,44 (5) |
| 12. | | | 89 | 5,23 (5) |
| | | | 90 | 4,09 (5) |
| | 91 | 5,25 | 91 | 2,26 (5) |
| | | | 92 | 3,56 (5) |
| | | | 96 | 3,65 (5) |
| 14. | | | 89 | 4,13 (4) |
| | | | 90 | 4,30 (5) |
| | | | 91 | 3,83 (4) |
| | | | 92 | 4,59 (4) |
| | | | 96 | 2,93 (4) |
| 16. | | | 89 | 0,39 (2) |
| | | | 90 | 2,77 (2) |
| | | | 91 | 3,18 (4) |
| | | | 92 | 4,00 (4) |
| | | | 96 | 2,13 (4) |
| 18. | | | 89 | 1,13 (2) |
| | | | 90 | 3,91 (1) |
| | | | 91 | 2,33 (2) |
| | | | 92 | 1,40 (3) |
| | | | 96 | 2,15 (3) |
| 20 | | | 89 | 0,23 (2) |
| | | | 90 | 0,00 (1) |
| | | | 91 | 2,11 (2) |
| | | | 92 | 0,00 (1) |
| | | | 96 | 1,05 (2) |

* = Mittelwert aus der in Klammer stehenden Anzahl von Forellen

Abbildung 25 zeigt exemplarisch die Übertragung des VHS-V vom Hecht auf die Regenbogenforelle. Das VHS-V wurde im Hecht Nr. 92 bis zu einem Titer von $-\log ID_{50}$ 4.25/25 µl vermehrt. Am 8. Tag nach Versuchsbeginn war in den Forellen ein Virustiter von $-\log ID_{50}$ 3.0/25 µl (als geometrischer Mittelwert angegeben) nachzuweisen. Im weiteren Verlauf stieg der Virusgehalt bis $-\log ID_{50}$ 4.5/25 µl an.

Abb. 25: Übertragung des VHS-V vom Hecht auf die Regenbogenforelle



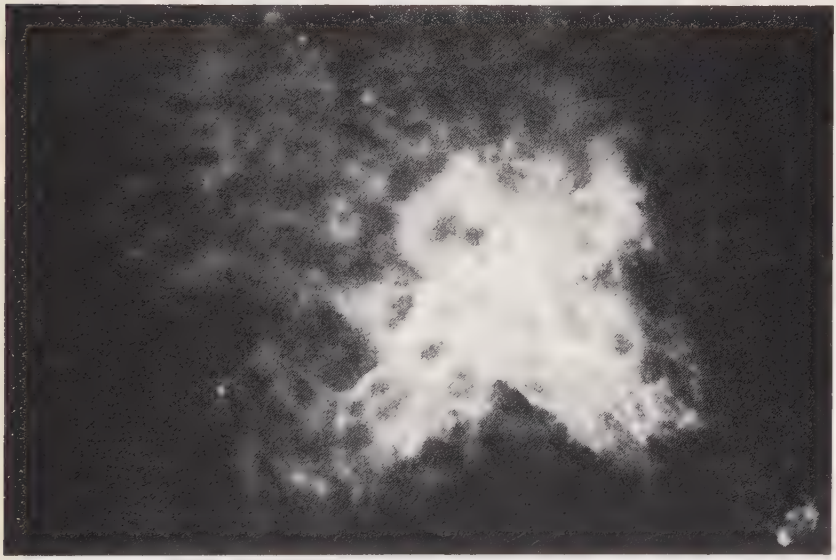

Virustitration im Blutserum von Hecht Nr. 92

Virustitration im Blutserum der später hinzugesetzten Regenbogenforellen (geometrische Mittelwerte aller Forellen)

Forellen zugesetzt

Die Virusidentifizierung erfolgte mit Hilfe der IF. Ein fluoreszierender Herd von RTG-2-Zellen ist in Abbildung 26 dargestellt. Die mit dem Serum der Hechte bzw. Regenbogenforellen infizierten RTG-2-Zellen zeigen eine gut abgegrenzte Immunfluoreszenz der infizierten Foci.

Abb. 26: IF-mikroskopische Aufnahme: Serum von Hecht Nr. 92 auf RTG-2-Zellen verimpft (x 275)



# V. DISKUSSION

In der Einleitung wurde bereits darauf hingewiesen, daß die virale hämorrhagische Septikämie (VHS) der Regenbogenforelle (Salmo gairdneri RICHARDSON) vermehrt in den Herbst- und Frühjahrsmonaten ausbricht. Demzufolge scheint die Wassertemperatur (WT) neben anderen Umweltfaktoren für das Seuchengeschehen eine wichtige Rolle zu spielen. Diese Tatsache ist bekannt und von verschiedenen in der Problemstellung erwähnten Autoren untersucht. Unbeachtet blieb jedoch bisher, wie sich die Änderung der WT, insbesondere eine Abkühlung des Wassers innerhalb eines kurzen Zeitraumes, auf den Krankheitsverlauf auswirkt.

Zu Beginn der Arbeiten wurde die WT unter natürlichen Bedingungen in einer Forellenteichwirtschaft untersucht, um Anhaltspunkte für die weiteren Experimente zur Pathogenese der VHS im Labor zu erhalten. Dazu wurde zunächst die WT im Zulauf einer von der VHS betroffenen Forellenteichwirtschaft kontinuierlich gemessen. Bei der Auswertung dieser Messung fiel auf, daß in den Frühjahrsmonaten erhebliche Temperaturschwankungen des Wassers zu verzeichnen waren. Die Temperaturdifferenz der Maximalwerte von Tag zu Tag betrug in den Monaten Februar bis März 1984 bis zu 7°C, während die tag-nacht-rhythmischen Temperaturunterschiede bis zu 8°C erreichten. Solche Temperaturschwankungen des Wasser dürften für die meisten oberflächenwasserabhängigen Fischzuchtbetriebe in dieser Jahreszeit typisch sein. Nur sogenannte "Quellbetriebe", deren Teiche von stenothermem Quellwasser gespeist werden, können über das ganze Jahr mit einer annähernd konstanten WT von 8°C - 10°C rechnen (Klee, 1985).

Von den oben beschriebenen Messungen der WT in der Natur ausgehend, sollte der Einfluß einer Änderung der WT auf den Krankheitsverlauf nach einer VHS-Infektion gezielt untersucht werden.

Vergleicht man Krankheitsverläufe von VHS-Infektionen bei unterschiedlichen WT, so ist zu beobachten, daß sich eine Erwärmung

des Wassers positiv auf die Forellen auswirkte. Als die WT nach der Infektion bei Regenbogenforellen, die an eine WT von 8°C adaptiert worden waren, auf 15°C angehoben wurde, betrugen die Ausfälle nur 17%. Hingegen stiegen die Verluste auf 72% bzw. 88% bei denjenigen Fischen, deren WT nach der Infektion von 15°C auf 8°C gesenkt wurde. Zu hohen Verlusten (89%) kam es weiterhin bei Forellen, die nach der Adaptation an 8°C infiziert und weiterhin bei dieser WT gehältert wurden.

Ebenfalls zu beachtlichen Verlusten (44% bzw. 55%) kam es bei denjenigen Regenbogenforellen, die an 15°C adaptiert worden waren und auch nach der Infektion bei dieser WT gehältert wurden.

Allein schon durch die verschieden hohe Mortalität wird der Einfluß der WT vor der Infektion auf den Krankheitsverlauf deutlich. Durch die Berechnung der geometrischen Mittelwerte aus den einzelnen Virustitern im Serum der Forellen können Virusvermehrung und Krankheitsverlauf in den jeweiligen Versuchsgruppen dargestellt und miteinander verglichen werden. Daraus ergibt sich für die erste Versuchsanordnung (vgl. Abb. 4) folgende Interpretation:

Nach der Erwärmung des Wassers (Abb. 4, Gruppe 1) konnte schon am 1. Tag p.i. ein geringer Virustiter beobachtet werden (-log $ID_{50}$ 0.1/25 µl). Demnach fand bereits zu diesem Zeitpunkt die erste "Auseinandersetzung" mit dem Pathogen statt. Am 2. und 3. Tag p.i. konnte kein Virusnachweis erfolgen. Dagegen war am 4. Tag p.i. ein Anstieg des Virustiters auf -log $ID_{50}$ 2.0/25 µl zu verzeichnen. Zwischen dem 7. und 10. Tag p.i. führte die Infektion zu vereinzelten Verlusten. Gleichzeitig war ein Abklingen der Infektion und ein kontinuierlicher Rückgang des Virusgehaltes bei den überlebenden Forellen festzustellen. Die Erwärmung des Wassers führte rasch zu einer Aktivierung des Abwehrsystems der Forellen. Bis zum 11. Tag p.i. hatten sich alle überlebenden Fische mit dem Pathogen auseinandergesetzt und die Infektion vergleichsweise schnell überwunden.

Blieb die WT nach der VHS-Infektion hingegen bei 8°C konstant, so

war ein erster Virusnachweis ab dem 2. Tag p.i. möglich (-log $ID_{50}$ 0.25/25 µl vgl. Abb. 4, Gruppe 3). Bis zum 6. Tag p.i. war eine gleichmäßige Zunahme des Virustiters bis -log $ID_{50}$ 4.75/25 µl zu beobachten. Hier wurde der suppressive Einfluß der niederen WT auf die Abwehrbereitschaft der Fische deutlich (vgl. auch Corbel, 1975). Die Forellen konnten in der Anfangsphase der Infektion möglicherweise auf Grund des supprimierten Immunsystems nicht schnell genug auf das Pathogen reagieren. Die Ausfälle waren dementsprechend hoch. Das Abwehrsystem der Fische ist noch nicht so weit untersucht, daß diese Frage klar beantwortet werden könnte; auf dieses Problem wird später nochmals hingewiesen.

In der Gruppe 2 (WT 15°C konstant vor und nach der VHS-Infektion) konnte vom 1. bis zum 6. Tag p.i. ein flacher Anstieg des Virustiters im Serum der Forellen verzeichnet werden (-log $ID_{50}$ 2.5/25 µl am 6. Tag p.i.). Die zwischen dem 5. und 13. Tag p.i. auftretenden Verluste von 44% waren insgesamt geringer als in den Gruppen 3 und 4, lagen jedoch höher als man bei dieser WT erwartet hatte. Seinerzeit kam Kölbl (1978) zu dem Ergebnis, daß die Infektion des VHS-V bei WT um 15°C zu geringen Verlusten führt, Neukirch (1984) dagegen setzt eine "gewisse Mortalitätsgrenze" zumindest für adulte Fische bei über 14°- 15°C an. Hier wird die Problematik deutlich, daß allgemeingültige Aussagen über den Krankheitsverlauf nur schwer zu treffen sind, da auch noch weitere Faktoren beim Ausbruch der Krankheit eine Rolle spielen. Der Einfluß des Pathogens selbst auf das Einzeltier und damit auf den Krankheitsverlauf wird an anderer Stelle noch zu diskutieren sein.

Im Falle eines Absenkens der WT von 15°C auf 8°C nach der VHS-Infektion war der Virusnachweis erst ab dem 3. Tag p.i. möglich (vgl. Abb. 4, Gruppe 4). Zu diesem Zeitpunkt lag der Virustiter bei -log $ID_{50}$ 2.5/25 µl und übertraf damit deutlich die Werte aller anderen Versuchsgruppen, auch jener, deren Forellen einer konstant niederen WT vor und nach der Infektion ausgesetzt waren (Gruppe 3). Außerdem war innerhalb dieser Forellenpopulation der höchste Virustiter überhaupt nachzuweisen (-log $ID_{50}$ 5.75/25 µl am 8. Tag p.i.). Hier wird offensichtlich, daß das bei einer WT von 15°C

intakte Immunsystem durch die Abkühlung des Wassers derart geschwächt wird, daß eine virale Infektion nicht bewältigt werden kann.

Vergleicht man den Verlauf der Virusvermehrung in den Fischpopulationen einer zweiten, ähnlichen Versuchsanordnung (s. Abb. 5 und 6) mit der Virusvermehrung der oben beschriebenen Gruppen 2 und 4, scheinen die Ergebnisse zunächst nicht völlig übereinzustimmen. Bei genauer Betrachtung werden aber Parallelen zur Virusvermehrung in der ersten Versuchsanordnung deutlich. Die Infektion bei einer WT von konstant 15°C manifestierte sich sogar stärker als in der vorherigen Versuchsanordnung. Der Virustiter in dieser Fischpopulation (s. Abb. 5 "Mittelwerte") erreichte schon am 3. Tag p.i. das Maximum (-log $ID_{50}$ 3.0/25 µl). Spätestens ab dem 7. Tag p.i. war auch hier bei den überlebenden Forellen ein Abklingen der Infektion zu beobachten. Wie aus den Einzelwerten der Abbildung 5 ersichtlich ist, war die Infektion in der Regel bis zum 12. Tag p.i. überwunden. Bei einzelnen Forellen war in dieser Versuchsgruppe die Inkubationszeit verlängert, so daß eine Virusvermehrung erst später stattfand, jedoch überlebten diese Tiere die Infektion.

Bei der Forellenpopulation des zweiten Versuches, die einer Senkung der WT ausgesetzt war (vgl. Abb. 6), erwies sich der Virustiter in der Anfangsphase als uneinheitlich. Aber auch hier trat ein hoher Titer erst ab dem 3. Tag p.i. auf. Der weitere Verlauf der Virusvermehrung in dieser Versuchsanordnung stimmte mit der ersten weitgehend überein. Hier wird sogar noch deutlicher, daß der Virustiter innerhalb der Forellenpopulation, die einer Abkühlung des Wasser ausgesetzt war, länger auf einem hohen Niveau bleibt als bei allen anderen bisher beschriebenen Versuchsgruppen.

Betrachtet man die Virusvermehrung im Einzeltier, so war bei der konstanten WT von 15°C zu beobachten, daß nur diejenigen Regenbogenforellen an der Infektion zugrunde gingen, bei denen der Virustiter -log $ID_{50}$ 5.0/25 µl überschritten hatte. Im Serum der überlebenden Forellen war ein rasches Absinken des Virustiters zu

verzeichnen. Bei den Fischen hingegen, die der Abkühlung des Wassers ausgesetzt worden waren, erlagen bereits diejenigen Tiere der Infektion, deren Virustiter den Wert -log $ID_{50}$ 3.0/25 µl überschritten hatte. Der Virusnachweis war zwar bei einzelnen Forellen dieser Versuchsanordnung erst ab dem 6. Tag p.i. möglich, trotzdem war der Anstieg des Virusgehaltes sehr steil und die Werte überstiegen den oben erwähnten "Schwellenwert".

An der Virusvermehrung im Einzeltier wird der negative Einfluß einer Wasserabkühlung noch einmal sehr deutlich. Die Tiere der Gruppe 2 der ersten Versuchsanordnung und die Tiere der Gruppe 1 der zweiten Versuchsanordnung waren an eine WT von 15°C adaptiert. Bisher ging man davon aus, daß bei dieser WT das Immunsystem aktiv ist, d.h. eine Infektion sich unter normalen Umständen nicht oder nur in geringem Umfang manifestiert (siehe bei Ellis und Schlotfeldt, 1985).

Im Falle einer Erwärmung des Wassers nach einer Adaptation der Fische an 8°C wird das supprimierte Immunsystem rasch reaktiviert. Daß es sich dabei um eine Reaktivierung des Immunsystems handeln dürfte, wird bei einem Vergleich mit dem Infektionsverlauf in Gruppe 4 (Abb. 4) deutlich. Die Fische beider Versuchsgruppen waren vor der VHS-Infektion an eine WT von 8°C adaptiert worden. Nach der Infektion konnten in Gruppe 1 und 4 zwei verschiedene Krankheitsverläufe der Forellen beobachtet werden (vgl. Abb. 4). In Gruppe 1 hatte eine im Vergleich wesentlich geringere Virusvermehrung in den Forellen stattgefunden.

Andererseits kann aus den vorher geschilderten Versuchen geschlossen werden, daß nach einer Abkühlung des Wassers innerhalb kurzer Zeit auf eine konstant niedere WT das Immunsystem der Regenbogenforellen nahezu völlig außer Kraft gesetzt wird. Für die so geschwächten Fische führt bereits ein relativ niederer Schwellenwert (-log $ID_{50}$ 3.0/25 µl bei 15°C → 8°C, im Gegensatz zu -log $ID_{50}$ 5.0/25 µl bei konstant 15°C) zum Tod. Weiterhin können diese Tiere in der Regel die Infektion auch dann nicht überleben, wenn der Virustiter im Serum schon wieder rückläufig ist (vgl. Abb. 6, Gruppe

1 und 3). Für dieses Phänomen konnte bisher keine Erklärung gefunden werden.

Im Gegensatz zu einer raschen Abkühlung des Wassers auf eine konstant niedere Temperatur führten andauernde Schwankungen der WT zwischen 15°C und 8°C zu keiner Verstärkung des Krankheitsverlaufes, aber zu einer länger anhaltenden Virusvermehrung und damit auch zur Virusausscheidung. Der Krankheitsverlauf war schwächer als bei den bisherigen Versuchen, dennoch war die Entstehung von "Carrier"-Fischen möglich. Die VHS-bedingten Ausfälle überstiegen mit 39% die Verluste mit 44% bzw. 55% bei einer konstanten WT von 15°C nicht. Es war aber eine "schleichende" Infektion in mehreren "Wellen" zu beobachten. Die erste Welle trat zwischen dem 6. und 10. Tag p.i., die zweite zwischen dem 15. und 16. Tag p.i. auf. Dies wird aus Abbildung 7 deutlich. Während der ersten Welle erreichte der Virustiter in der Forellenpopulation sein Maximum am 9. Tag p.i. (-log $ID_{50}$ 1.55/25 µl), der zweite Gipfel (-log $ID_{50}$ 0.95/25 µl) war am 15. Tag p.i. zu verzeichnen. Der Anstieg des Virustiters folgte meist der Abkühlung des Wassers auf 8°C, dennoch vermehrte sich das VHS-V nicht in dem Maße, wie es bei der Senkung der WT auf konstant 8°C zum Ausdruck kam.

Auch bei anderen viralen Infektionskrankheiten der Salmoniden kann generell ein verstärktes Auftreten der Krankheitssymptome bei niedrigen WT festgestellt werden. Hetrick et al. (1979) erhielten die höchsten Verluste von IHN-V-infizierten (infektiöse hämatopoetische Nekrose) Regenbogenforellen bei WT zwischen 6°C und 9°C (80% bzw. 90%), während die Verluste bei Temperaturen um 15°C auf 10% zurückgingen. Amend (1970) wies auf den therapeutischen Effekt einer Erwärmung des Wassers bei der IHN hin. So konnte er die Mortalität des Hakenlachses (Oncorhynchus nerka, WALBAUM) gering halten, wenn die WT während der ersten Infektionsphase auf 18°C erhöht wurde.

Für die infektiöse Pankreasnekrose der Salmoniden (IPN) wurde der Einfluß der WT auf den Krankheitsverlauf von Dorson und Torchy (1981) verdeutlicht. Nach einem Abkühlen des Wassers von 16°C auf

10°C stiegen die Ausfälle bei IPN-infizierter Regenbogenforellenbrut auf ca. 55%. Eine Erwärmung des Wassers von 10°C auf 16°C reduzierte hingegen die Verluste auf 30%.

Aus diesen auffallend übereinstimmenden Beobachtungen hinsichtlich des Krankheitsverlaufes einer viralen Infektion und der Schwächung des Immunsystems der Salmoniden bei niederen bzw. absinkenden WT ergibt sich die Frage nach der Regulation der Immunvorgänge im Fisch bei diesen Temperatursituationen. Auf diesem Gebiet herrscht bisher speziell für die Regenbogenforelle noch wenig Klarheit. Allgemeine Untersuchungen zur Ak-Bildung in Teleosteern zeigten, daß die Regulation des Immunsystems temperaturabhängig ist. So konnte Avtalion (1969) beim Karpfen eine Ak-Bildung gegen bovines Serum-Albumin (BSA) bei einer WT von 25°C nachweisen, bei 12°C hingegen war kein Ak-Nachweis mehr möglich.

Die oben beschriebenen Ergebnisse hinsichtlich der Abwehrreaktion bei Schwankungen der WT weisen allerdings darauf hin, daß das Immunsystem der Regenbogenforellen nicht unmittelbar nach einem Abkühlen des Wassers zu arbeiten aufhört. Erst nach einem bestimmten, noch nicht belegten Zeitraum, in dem die Fische dem kalten Wasser ausgesetzt waren, wird eine Schwächung des Abwehrsystems erkennbar (vgl. Abb. 4 und 7). Biologisch erscheint dieses Phänomen sinnvoll, da die Forellen unter natürlichen Bedingungen im Teich den tagesrhythmischen Temperaturunterschieden ausgesetzt sind. Als verantwortlich für die verminderte Effizienz des Abwehrsystems bei länger anhaltenden niederen WT sieht Manning (1983) ein Dominieren von Suppressorzellen an.

Ein Vergleich der Temperatureinflüsse auf die Virusvermehrung im Organismus und in den Zellkulturen legt nahe, daß die entscheidenden Vorgänge, die für den Ausbruch der Krankheit bei niederen bzw. sinkenden WT verantwortlich sind, auf seiten des Wirts zu suchen sind. Das Temperaturoptimum für die Vermehrung des VHS-V in der Zellkultur liegt bei 14°C (Ahne und Weiler, 1978), während das Virus gerade in diesem Temperaturbereich vom Abwehrsystem der Fische erfolgreich bekämpft werden kann. Dagegen führen

Temperaturen von weniger als 10°C oder Temperatursenkungen auf konstant niedrige Werte zu den größten Verlusten in der Fischpopulation. Ähnliche Gegebenheiten liegen auch beim IHN-V und IPN-V vor (Temperaturoptimum in der Zellkultur: IHN-V: 15°C - 20°C; IPN-V: 16° - 17°C. Höchste Mortalität infizierter Forellen bei WT von IHN-V: 9°C, IPN-V: 10°C; Hetrick et al., 1979; Dorson und Torchy, 1981).

Neben dem Parameter WT gibt es weitere, zum Teil nur schwer erfaßbare Faktoren, die offenbar den Verlauf einer VHS-Infektion beeinflussen können. Dies zeigte sich bei verschiedenen Infektionsversuchen, die bei einer WT von 12°C durchgeführt worden waren, und in denen es sowohl zu apparenten als auch inapparenten Krankheitsverläufen kam, obwohl die jeweiligen Versuchsbedingungen bzw. -durchführungen identisch waren (derselbe Infektionsmodus, dieselbe WT, tägliche Reinigung der Versuchsanlagen etc.).

Bei einem Vergleich des Virusgehalts im Serum der Regenbogenforellen im Verlauf von apparent bzw. inapparent verlaufenden VHS-Infektionen konnten erhebliche Unterschiede beobachtet werden. So war bei einer apparenten Infektion ein steiler Anstieg des Virustiters zu verzeichnen, der schon am 3. Tag p.i. sein Maximum erreichte (-log $ID_{50}$ 4.05/25 µl). Bis zum 7. Tag p.i. hielt sich der Titer auf einem leicht absinkenden Niveau. Nach dieser Zeit trat bei den bis dahin überlebenden Forellen die Erholungsphase ein. Dennoch war erst am 16. Tag p.i. kein Virusnachweis mehr im Serum der Forellen möglich (Abb. 8).

Bei einer inapparenten Infektion stieg der Virustiter deutlich geringer an und erreichte sein Maximum am 4. Tag p.i. (-log $ID_{50}$ 1.75/25 µl). Nach diesem Zeitpunkt war ein kontinuierlicher Rückgang des Virustiters zu beobachten, und schon am 11. Tag p.i. war kein Virusnachweis mehr möglich. Die inapparente Infektion verlief somit schwächer, die Virusvermehrung war deutlich geringer, und die Forellen hatten die Infektion in einem kurzen Zeitraum überstanden.

Wie unterschiedlich die VHS-Infektion in den Regenbogenforellen

verlaufen kann, konnte in einem weiteren Versuch beobachtet werden. Bei zwei Forellen, die unter völlig gleichen Versuchsbedingungen gehalten worden waren, manifestierte sich dennoch der Krankheitsverlauf verschieden.

Bei der einen Regenbogenforelle war ab dem 8. Tag p.i. eine rasche Zunahme des Virusgehalts sowohl im Plasma als auch in den Blutzellen zu verzeichnen (Abb. 13). Diese Reaktion blieb bis zum Tode des Tieres am 10. Tag p.i. erhalten. Als klinischer Befund war eine hochgradige Anämie festzustellen.

Bei der anderen Forelle konnte aus den Blutzellen über den gesamten Versuchszeitraum nur wenig VHS-V isoliert werden, während das Plasma desselben Fisches nach neun Tagen wesentlich mehr Virus enthielt (vgl. Abb. 12). Dieser Fisch überlebte zwar die Infektion nicht, er verendete aber erst am 18. Tag p.i. Die Krankheitssymptome entsprachen denen der akuten Phase, jedoch war die Anämie im Vergleich zu der oben beschriebenen Forelle schwach ausgebildet.

Diese Ergebnisse lassen die Schlußfolgerung zu, daß neben den abiotischen Faktoren (z.B. WT) die "Konstitution" der Regenbogenforellen für den Ausgang einer VHS-Infektion eine bedeutende Rolle spielt. Die Konstitution der Regenbogenforellen wird durch das synergistische Zusammenarbeiten des Erregers mit belebten und unbelebten Umweltfaktoren beeinflußt (Enzmann und Konrad, 1984). So kann sich ein im Teich vorhandenes Pathogen in Abhängigkeit von der Konstitution der Regenbogenforellen und den dort herrschenden Umweltfaktoren unbemerkt ausbreiten und unter bestimmten Voraussetzungen einen akuten Seuchenausbruch hervorrufen. Bei den oben beschriebenen Versuchen zeigte sich, daß auch bei inapparenten Infektionsverläufen eine Übertragung des VHS-V auf später hinzugesetzte, bisher virusfreie Kontrolltiere stattfand. Die auf diese Weise infizierten Kontrolltiere zeigten oftmals ebenfalls keine Krankheitssymptome. In der Natur könnten diese Forellen als "Carrier"-Fische fungieren. Neukirch (1985) konnte z.B. eine Persistenz des VHS-V in "Carrier"-Fischen bis zum 412. Tag p.i. nachweisen.

Weiterhin entwickelte sich aus einer inapparenten VHS-Infektion ein akuter Krankheitsverlauf, nachdem man die Wasserqualität während des Infektionsversuches verschlechtert hatte. Nach einem anfänglich symptomlosen Verlauf der VHS-Infektion brach die Krankheit nach Abstellen der Filteranlage mit einer Verzögerung von vier Tagen aus, und die Verluste stiegen in den folgenden vier Tagen auf 40% (Abb. 9).

In weiteren Experimenten wurde versucht, die hier aufgezeigte Problematik anhand der Ak-Bildung näher zu beleuchten. Das Geschehen bei der Ak-Bildung im Fisch erscheint sehr komplex. So hängt die Kinetik der Ak-Produktion zunächst davon ab, ob sich das Tier mit einem Ag zum ersten oder zum wiederholten Mal auseinandersetzt. Bei der Primär-Immunantwort auf den Ag-Stimulus ist die induktive Phase im Fisch im Vergleich zu den Säugetieren und Vögeln wesentlich länger (Ellis und Schlotfeldt, 1985). Darüber hinaus wird die Immunantwort im Fisch, wie bei allen wechselwarmen Wirbeltieren, von der Umgebungstemperatur beeinflußt (Krantz et al., 1963), wobei, wie schon erwähnt, der Mechanismus der Temperaturabhängigkeit nicht bekannt ist. Avtalion et al. (1973) stellten fest, daß bei der Ak-Produktion nur die Induktionsphase der Primärantwort temperaturabhängig sei. Dorson (1972) sowie Maisse und Dorson (1976) konnten bei Regenbogenforellen, die bei einer WT von 10°C mit Aeromonas salmonicida infiziert worden waren, nie vor dem 15. Tag p.i. Ak gegen den Erreger nachweisen. Zwischen dem 30. und 50. Tag p.i. erreichte der Ak-Titer das Maximum und sank zwischen dem 100. und 150. Tag p.i. unter die Nachweisgrenze ab.

Der Verlauf der Ak-Bildung gegen das VHS-V in der Regenbogenforelle wurde in der vorliegenden Arbeit qualitativ untersucht. Die Forellen waren mit dem Ag zum ersten Mal in Kontakt gekommen, d.h. es handelte sich bei dieser Versuchsdurchführung um die Ak-Bildung im Verlauf einer primären Immunantwort. Mit der Gegenstrom-Immunelektrophorese (GIE) war am 23. Tag p.i. ein erster Ak-Nachweis möglich. Bis zum 85. Tag p.i. konnten in sechs von sieben Regenbogenforellen Ak nachgewiesen werden. Nach diesem Zeitpunkt nahm die Anzahl der Ak-positiven Fische ab. Nach dem 111. Tag p.i. waren

Ak nicht mehr regelmäßig nachweisbar (vgl. Abb. 15).

Die schnelle Abnahme des Ak-Gehaltes ist erstaunlich. Die Frage, ob dies bei der Abwehr viraler Infektionen die Regel ist oder ob es sich im geschilderten Fall um einen außergewöhnlich schwachen Ak-Stimulus handelte, bleibt weiteren ausführlichen Untersuchungen überlassen.

Hinsichtlich des Immunstatus der Regenbogenforelle nach überstandener VHS-Infektion und der Resistenz gegenüber einer Zweitinfektion gibt es bisher nur wenige Berichte. De Kinkelin et al. (1984) sind der Meinung, daß die von den Teichwirten beobachtete Resistenz der Regenbogenforellen nach überstandener Reinfektion schwerlich auf eine spezifische Immunität zurückgeführt werden kann, sondern daß andere pathophysiologische Ereignisse die Empfänglichkeit der Regenbogenforelle beeinflussen. So gelang es Jørgensen (1971, 1974) zum Beispiel nicht, neutralisierende Ak gegen das Egtved-Virus (VHS-V) in Regenbogenforellen nachzuweisen, die eine natürliche Infektion überlebt hatten.

Neukirch und Glass (1984) konnten bei zwei Regenbogenforellen, die eine experimentelle VHS-Infektion überlebt hatten, nach einer Zweitinfektion keine Krankheitssymptome feststellen, obwohl sie aus dem Harn der Forellen infektiöses Virus über einen Zeitraum von mehr als 30 Tagen nach der Zweitinfektion isolieren konnten.

Auf Grund der geringen Zahl der Tiere, die in unserem Labor experimentell reinfiziert worden waren, können hierzu keine allgemeingültigen Aussagen gemacht werden. Auf einen interessanten pathologischen Befund im Fall der Regenbogenforelle Nr. 20, der für eine virusbedingte Schädigung spricht, soll an dieser Stelle jedoch trotzdem eingegangen werden. Das reinfizierte Tier zeigte 48 Tage nach der Zweitinfektion das VHS-spezifische Schwimmverhalten, wie es der nervösen Phase entspricht. Weiterhin wurden vermehrt Liquor in der Schädelkapsel und Zellschädigungen im Stammhirn beobachtet (vgl. Abb. 16 und 17). Diese Symptome traten allerdings erst auf, nachdem im Serum der Forelle kein Virus mehr nachweisbar war. Die

Virusvermehrung in den reinfizierten Regenbogenforellen beschränkte sich auf einen kurzen Zeitraum nach der Infektion.

Um den Ablauf des VHS-Seuchengeschehens in den Teichen besser beleuchten zu können, wurden zusätzlich zu den geschilderten Laboruntersuchungen auch epidemiologische Studien betrieben.

Die zunehmende Zahl von VHS-Ausbrüchen im Süden von Baden-Württemberg im Frühjahr 1983 warf die Frage auf, ob diese auf eine Neueinschleppung in die Teichwirtschaften oder auf ein endemisches Vorkommen des Virus in dieser Region zurückzuführen sind.

Jørgensen (1980) wies auf die Gefahr einer Ausschwemmung des Virus aus den von der VHS betroffenen Teichwirtschaften in die Forellenpopulationen der Vorfluter hin. Dabei spielten nicht nur die drei bekannten Serotypen des VHS-V ($F_1$, $F_2$ und 23.75) eine Rolle. Von acht untersuchten Isolaten waren drei sowohl für die Regenbogenforelle als auch für die Bachforelle (Salmo trutta fario L.), die restlichen fünf Isolate nur für die Regenbogenforelle pathogen. In seinem Resümee wies Jørgensen auf die Gefahr hin, daß die Bachforelle ein potentielles Reservoir für die VHS im Bach darstellen könnte. Enzmann und Konrad (1984) wiesen auf die Möglichkeit hin, daß umgekehrt eine infizierte Fischpopulation im Bach auch einen anhaltenden Infektionsdruck auf die Regenbogenforellen im Teich auszuüben vermag. Das VHS-V scheint in dem "Rückkopplungssystem" zwischen Teich und Bach ideale Überlebenschancen vorzufinden. Im folgenden werden epidemiologische Studien diskutiert, die an einem Bach durchgeführt wurden, der zwei anliegende Fischzuchtbetriebe speist, die im Frühjahr 1983 mit der VHS zu kämpfen hatten.

Die Ergebnisse der Elektroabfischung im Herbst 1983 (ca. sechs Monate nach dem ersten Seuchengeschehen in den Forellenteichwirtschaften) zeigten, daß unterhalb der Teichwirtschaften ($FZ_1$ und $FZ_2$) prozentual viele VHS-antikörperpositive Bachforellen vorhanden waren (37% unterhalb $FZ_1$, 41% unterhalb $FZ_2$, Abb. 21). Da aber auch oberhalb des für Fische unüberwindbaren Stauwehrs bei $FZ_1$ 21% Ak-positive Bachforellen gefunden wurden, lag der Verdacht eines

endemischen Vorkommens des VHS-V in dem Gewässersystem nahe (Konrad et al., 1984). In der Folge konnte gezeigt werden, daß die Bachforelle nach experimenteller Infektion sowohl über die Kiemen als auch über das Wasser für den Serotyp $F_1$ empfänglich ist und sich mit dem Pathogen auseinandersetzt. Dabei traten im Tierversuch in der Regel keine pathologischen Veränderungen auf. Das VHS-V war im Serum der infizierten Tiere im ersten Versuch nur für einen kurzen Zeitraum (zwischen dem 3. und 5. Tag p.i.) und nur mit einem geringen Titer nachweisbar. In einem weiteren Versuch konnte die Übertragung des VHS-V von der Bachforelle auf die Regenbogenforelle nachgewiesen werden. Die Bachforellen waren sowohl über die Kiemen als auch über das Wasser infiziert und die Regenbogenforellen fünf Tage später in die Versuchsanlage hinzugesetzt worden. Während die VHS-Infektion bei den Bachforellen symptomlos verlief und über den Versuchszeitraum nur ein geringer Virusgehalt im Serum festgestellt werden konnte, manifestierte sich die VHS bei den Regenbogenforellen. 66,6% der Regenbogenforellen verendeten nach kurzer, heftiger Krankheit (vgl. Abb. 22). Der geringe Virusgehalt im Blutserum der Bachforellen und Bovos (1985) Ergebnisse, der in den Organen von Bachforellen aus einem Fluß, an den ebenfalls von der VHS betroffene Forellenzuchtbetriebe anrainen, kein VHS-V isolieren konnte, weisen darauf hin, daß die Bachforelle vom VHS-V nicht geschädigt wird, wohl aber als ein Überträger der Krankheit in Frage kommt. Zusätzlich konnte nach der experimentellen Infektion der Bachforellen in einigen Tieren ab dem 23. Tag p.i. ein qualitativer Ak-Nachweis geführt werden. Die Ak blieben bis zum Tode der jeweiligen Bachforelle nachweisbar (vgl. Abb. 15).

Angeregt durch die Aussage des Teichwirts - er habe kurze Zeit vor dem VHS-Ausbruch verendete Junghechte (Esox lucius L.) in einem seiner Teiche gefunden - und angeregt durch wissenschaftliche Arbeiten, die die Existenz des VHS-V im Hecht beschrieben (Meier und Jorgensen, 1980; Wizigmann et al., 1980; Meier und Pfister, 1981) wurden die in den Seen vorkommenden Hechte im Frühjahr 1984 stichprobenartig auf VHS-Ak untersucht. Der hohe Anteil an Ak-positiven Hechten (30,7%) (Abb. 21) ließ die Folgerung zu, daß das VHS-V schon früher in das Gewässersystem eingeschleppt worden

war. In diesem Fall hätten über das gesamte Gewässersystem Ak-positive Fische verteilt sein müssen.

Eine weitere Abfischung im Herbst 1984 bestätigte diese Vermutung. Von den Seen ausgehend, fand man eine Verteilung von Ak-positiven Bachforellen, deren größte Zahl (41%) unterhalb der Seen gefunden wurde. Gleichzeitig war festzustellen, daß sich der Infektionsdruck durch das VHS-V aus den Teichanlagen auf die Bachforellenpopulation im Bach seit der Abfischung im Vorjahr verstärkt hatte. Dies war dadurch bedingt, daß bei den Regenbogenforellen in den Teichanlagen nach dem ersten Seuchenausbruch im Frühjahr 1983 im Dezember desselben Jahres erneut die Seuche auftrat.

Unterhalb der Fischzuchtbetriebe stieg der Prozentsatz von Ak-positiven Bachforellen auf 60,7% bzw. 66,6%. Auch an der Probenentnahmestelle 2 (vgl. Abb. 21) zwischen den beiden Teichanlagen war es zu einer Zunahme der Ak-positiven Bachforellen um 28% gekommen. Die VHS-Infektion verlief bei den Bachforellen jedoch inapparent, da zu keinem Zeitpunkt kranke Fische im Bach beobachtet werden konnten. Diese Beobachtung konnte nicht nur bei freilebenden Bachforellen gemacht werden, sondern Jørgensen (1982) konnte auch aus freilebenden Regenbogenforellen, die unterhalb von Forellenzuchtbetrieben mit VHS-Vorkommen gefunden wurden, VHS-V isolieren. Diese Forellen zeigten dabei ebenfalls keine Krankheitssymptome.

Der Prozentanteil VHS-antikörperpositiver Hechte war bei der Abfischung im Frühjahr 1985 nur um 3,3% höher als im Vorjahr. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Zahl der untersuchten Hechte insgesamt größer war als bei der ersten Abfischung. Da die Anzahl der Ak-positiven Hechte in den Seen im Verhältnis konstant geblieben ist, kann man einerseits eine Neuinfektion innerhalb der Hechtpopulation durch neue Besatzhechte ausschließen, andererseits liegt die Vermutung nahe, daß das VHS-V in der Hechtpopulation über einen längeren Zeitraum persistiert. Diese Annahme wird gestützt durch Ahne (1985), der eine Übertragung des VHS-V von Hecht zu Hecht per os nachwies. Dabei fütterte er 30 bis 40 cm großen, bisher virusfreien Hechten mit VHS-V infizierte einsömmerige

Hechte. Die Tiere zeigten nach einigen Tagen die für die VHS typischen Hämorrhagien in der Muskulatur. Zusätzlich war in den erkrankten Hechten ein Virusnachweis möglich.

Durch die oben bereits erwähnte Aussage des Teichwirts - er habe verendete Junghechte vor dem VHS-Ausbruch in einem seiner Teiche gefunden - auf die Möglichkeit einer Übertragung der Krankheit vom Hecht auf die Regenbogenforelle im direkten Kontakt aufmerksam geworden, wurde im Labor die Übertragung des Virus von der einen Fischart auf die andere untersucht. Die über die Kiemen und i.p. infizierten Hechte verendeten an der Krankheit. Bei allen später für den Übertragungsnachweis hinzugesetzten Regenbogenforellen war ein spezifischer Virusnachweis möglich und mindestens 40% der Tiere gingen an der Infektion zugrunde (Abb. 25). Damit kann auf die Gefahr hingewiesen werden, daß der Hecht als empfänglicher Wirt die Seuche verbreitet und zusätzlich nicht nur als Überträger, sondern auch als mögliches Virusreservoir in der Wildfischpopulation anzusehen ist.

Nach den bisherigen Ergebnissen ist zu schließen, daß der VHS-Ausbruch in der ersten Forellenzuchtanlage ($FZ_1$ Abb. 18) im Frühjahr 1983 nicht, wie bei vielen anderen Ausbrüchen nachgewiesen, durch schlechte Hygienebedingungen oder falsche Besatzmaßnahmen in den Teichen ausgelöst worden war. Die Tatsache, daß oberhalb des Stauwehrs (Abb. 21) Bachforellen mit Ak gegen das VHS-V vorhanden waren, deutet darauf hin, daß die Infektion aus dem Bach in die Teichwirtschaft übergegangen ist. Der Erreger selbst muß also schon zu einem früheren Zeitpunkt in das Gewässersystem eingeschleppt worden sein. Die ungünstigen Temperaturverhältnisse im Frühjahr jenes Jahres begünstigten die explosionsartige Ausbreitung der VHS in den Forellenzuchtbetrieben.

Die Gefahr einer erneuten Verschleppung der VHS aus dem Bach in die Teichanlagen dürfte demnach auch nach völliger Sanierung dieser Fischzuchtbetriebe bestehen bleiben. Um die Möglichkeit einer erneuten Infektion gering zu halten, muß ein direkter Kontakt mit der Wildfischpopulation völlig unterbunden werden. Das Besatzmaterial,

das sowohl in die Seen als auch in die Fließstrecken des Gewässers eingebracht wird, sollte aus VHS unbedenklichen Beständen entnommen werden.

Aus den besprochenen Ergebnissen des experimentellen Teils und den epidemiologischen Untersuchungen wird das Zusammenspiel von belebten und unbelebten Faktoren als Auslöser für einen VHS-Ausbruch deutlich. Ist das VHS-V im Wildfischbestand eines Vorfluters vorhanden, nimmt die Gefahr eines VHS-Ausbruches in den Teichanlagen eines Fischzuchtbetriebes automatisch zu, besonders zu den Jahreszeiten, in denen mit einem raschen Absinken der Wassertemperaturen auf niedrige Werte, also im Frühjahr und im Herbst, zu rechnen ist. Andererseits kann eine VHS-Infektion aus dem Bach in die Teichwirtschaft eingeschleppt werden, ohne daß dies zu einem akuten Krankheitsausbruch führen muß. Die Infektion kann im Teich so lange inapparent verlaufen, bis durch eine plötzliche Änderung der Umweltbedingungen die Seuche offenbar wird.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Die Auswertung kontinuierlicher Messungen der Wassertemperatur (WT) im Zulauf einer Forellenteichwirtschaft zeigte, daß während der Frühjahrsmonate beachtliche tagesrhythmische Unterschiede der WT zu beobachten waren. Von dieser Beobachtung ausgehend, wurde der Einfluß der WT auf den Krankheitsverlauf vor und nach einer VHS-Infektion bei Regenbogenforellen (Salmo gairdneri RICHARDSON) untersucht.

Vor einer experimentellen VHS-Infektion waren Regenbogenforellen über einen längeren Zeitraum an bestimmte WT adaptiert worden, nach der Infektion erfolgte eine Änderung der WT bei den Versuchsgruppen nach einem bestimmten Schema.

Eine Erwärmung des Wasser von 8°C auf 15°C wirkte sich günstig auf das Abwehrsystem der Forellen aus, während konstant niedrige WT oder eine rasche Abkühlung des Wassers von 15°C auf 8°C hohe Verluste zur Folge hatten. Der Krankheitsverlauf und die Virusvermehrung wurden sowohl innerhalb der Forellenpopulation als auch im Einzeltier untersucht. Dabei konnte beim Einzeltier festgestellt werden, daß nach einer Abkühlung des Wassers bereits ein geringerer Virustiter zum Tod der Forellen führte, als dies bei höheren WT der Fall war.

Im Gegensatz zu einer raschen Abkühlung des Wasser auf eine konstant niedrige Temperatur führten andauernde Schwankungen der WT zwischen 15°C und 8°C zu keiner Verstärkung des Krankheitsverlaufes. Hier wurde eine inapparente Verlaufsform beobachtet, bei der aber eine Übertragung des VHS-V auf nicht infizierte Kontrolltiere nachweisbar war.

Bei einem Vergleich von apparent und inapparent verlaufenen VHS-Infektionen wurden Unterschiede in der Virusvermehrung und die damit verbundene Problematik aufgezeigt. Aus einer zunächst inapparent verlaufenen VHS-Infektion konnte ein akuter Krankheits-

verlauf induziert werden, indem die Wasserqualität während des Versuches verschlechtert wurde.

Die Antikörper-Bildung und der Immunstatus von Regenbogenforellen, die eine VHS-Infektion überlebt hatten, wurden untersucht. Der Nachweis von spezifischen Ak konnte vom 23. Tag p.i. bis zum 110. Tag p.i. qualitativ erstellt werden. Bei einer Zweitinfektion von Regenbogenforellen am 396. Tag p.i. konnten nach 48 Tagen bei einer Forelle VHS-Symptome festgestellt werden, die denen der nervösen Phase entsprachen.

Der VHS-Ausbruch in einer Teichwirtschaft, in der mehrere Jahre zuvor kein Seuchengeschehen zu beobachten war, gab Anlaß zu der Überlegung, ob es sich hierbei um eine Neueinschleppung des Erregers in die Teichwirtschaft durch mangelnde Hygiene oder andere belebte oder unbelebte Vektoren gehandelt habe oder ob die Einschleppung des Virus aus dem Bach erfolgte. Deshalb wurde die Wildfischpopulation in diesem Gewässersystem auf VHS-Antikörper untersucht. Die Ergebnisse ließen den Schluß zu, daß der Erreger in diesem Gebiet endemisch ist und die Infektion aus dem Bach in die Teichwirtschaft übergegangen war.

Durch Infektionsversuche an Bachforellen (Salmo trutta fario L.) und Hechten (Esox lucius L.) konnte gezeigt werden, daß sich beide Fischarten in verschiedenem Ausmaß mit dem Pathogen auseinandersetzen. Während bei den Bachforellen keine klinischen Anzeichen einer Erkrankung beobachtet werden konnten, verendeten die Hechte an der VHS-Infektion.

Das VHS-V war in den Bachforellen nur über einen kurzen Zeitraum in der Anfangsphase der Infektion nachweisbar, ab dem 23. Tag p.i. bis zum Tode der Forellen wurden Ak gefunden. Sowohl von den Bachforellen als auch von den Hechten fand im Versuch eine Übertragung des VHS-V auf Regenbogenforellen statt. Bei allen später hinzugesetzten Kontrollforellen war VHS-V nachweisbar. Die VHS-bedingten Ausfälle betrugen hier zwischen 40% und 80%.

## VII. LITERATUR

1. Ahne, W. 1985a. Occurrence of VHS virus in wild white fish (Coregonus sp.). Zbl. Vet. Med. 32, 73-75.
2. Ahne, W. 1985. Viral infection cycles in pike (Esox lucius L.). Z. angew. Ichthyol. 1, 90-91.
3. Ahne, W., R.D. Negele und B. Ollenschläger. 1976. Vergleichende Infektionsversuche mit Egtved-Viren (Stamm $F_1$) bei Regenbogenforellen (Salmo gairdneri) und Goldforellen (Salmo aguabonita). Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 89, 161-164.
4. Ahne, W. und A. Weiler. 1978. Untersuchungen zur Virusempfänglichkeit von Fischzellkulturen. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 87, 56-59.
5. Amend, D.F. 1970. Control of infectious hematopoietic necrosis virus disease by elevating the water temperature. J. Fish. Res. Board. Can. 27, 265-270.
6. Amlacher, E., Chr. Rudolph, J. Ude, und H.-J. Eisengarten. 1982. Virale hämorrhagische Septikämie (VHS) der Regenbogenforelle (Salmo gairdneri RICHARDSON) - Pathologie, elektronenmikroskopischer Virusnachweis und peripheres Blutbild. Arch. exper. Vet. med. 36, 193-201.
7. Avtalion, R.R. 1969. Temperature effect on antibody production and immunological memory in carp (Cyprinus carpio) immunized against bovine serum albumin (BSA). Immunology 17, 927-931
8. Avtalion, R.R., A. Wojdani, Z. Malik, R. Shahrabani und M. Duczyminer. 1973. Influence of environmental temperature on the immune response in fish. Curr. Topics Mikrobiol. Immun. 61, 1-35.
9. Bellet, R. 1958. Du Syndrôme entéro-hépato-rénal chez la truite arc-en-ciel de pisciculture. Bull. Franc. Piscicult. 189, 113-124.
10. Besse, P. 1955. Recherches sur l'étiologie de l'anémie infectieuse de la truite. Bull. Acad. Vet. 28, 194-199.
11. Besse, P. 1956. L'anémie pernicieuse des truites. Ann. Stat. Centr. Hydrob. Appl. 6, 441-467.
12. Bovo, G. 1985. Investigations on the presence of viral haemorrhagic septicaemia and infectious pancreatic necrosis viruses-carriers in Sacra river free living fishes near some trout

farms. 2nd International Conference of the European Association of Fish Pathologists. Montpellier. 2.-5. Sept. 1985.

13. Castric, J. und P. de Kinkelin. 1984. Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, sea bass (Dicentrarchus labrax) and turbot (Scophthalmus maximus), to viral haemorrhagic septicaemia. Aquaculture 41, 203-212.
14. Chilmonczyk, S. 1980. Some aspects of trout gill structure in relation to Egtved virus infection and defence mechanisms. In: Fish Diseases, Proceedings in Life Sciences. Ed. Ahne, W. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. S. 18-22.
15. Corbel, M.J. 1975. The immune response in fish: a review. J. Fish. Biol. 7, 539-563.
16. Deufel, J. und Ch. v. Pöllnitz. 1977. Zytodiagnostik von Krankheiten bei Regenbogenforellen (Salmo gairdneri RICHARDSON). Fisch und Umwelt 4. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. S. 15-24.
17. Deuter, A. 1984. Vergleichende biochemische und serologische Untersuchungen an zwei fischpathogenen Rhabdoviren (VHS-V und SVC-V). Diss. der Fakultät für Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
18. Dorson, M. 1972. La réponse immunitaire chez la truite arc-en-ciel (Salmo gairdneri): quelques caractéristiques des immunoglobulines produites lors d'une réaction primaire. Ann. Rech. Vétér. 3, 93-107.
19. Dorson, M. und P. de Kinkelin. 1974. Mortalité et production d'interferon circulant chez la truite arc-en-ciel après infection experimentale avec le virus d'Egtved: influence de la temperature. Ann. Rech. Vétér. 5, 365-372.
20. Dorson, M. und C. Torchy. 1981. The influence of fish age and water temperature on mortalities of rainbow trout, Salmo gairdneri RICHARDSON, caused by a european strain of infectious pancreatic necrosis virus. J. Fish. Dis. 4, 213-221.
21. Dyk, V. 1940. Die Sommertemperaturen der Forellengewässer. Arch. Hydrobiol. 37, 273-277.
22. Ellis, A.E. und H.-J. Schlotfeldt. 1985. Immunologie der Knochenfische. In: Grundlagen der Fischpathologie. Hrsg:

Roberts, R.J. und H.-J. Schlotfeldt. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg. S. 98-111.

23. Enzmann, P.-J. 1980. Preparation of salmonid white blood cells for virological studies. In: Fish Diseases, Proceedings in Life Sciences. Ed. Ahne, W. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. S. 186.
24. Enzmann, P.-J. 1981. Rapid identification of VHS-virus from trout by immunofluorescence. Develop. biol. Standard. 49, 57-62.
25. Enzmann, P.-J. 1983. Antigennachweis bei der akuten und chronischen Viralen Hämorrhagischen Septikämie der Regenbogenforelle. Fisch und Umwelt 17. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. S. 23-28.
26. Enzmann, P.-J., F. Weiland und D. Härtner. 1980. Electron microscopical studies on VHS virus. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Org. A 248, 25.
27. Enzmann, P.-J. und M. Konrad. 1984. Die VHS der Regenbogenforelle und ihre Bekämpfung in epidemiologischer Sicht. Tierärztl. Umschau 39, 886-892.
28. Finkenstädt, H. 1979. Die mit der Alzianblau-Perjodsäure-Schiff-(PAS) Methode darstellbaren Strukturen der Niere von gesunden und an Viraler Hämorrhagischer Septikämie (VHS) erkrankter Regenbogenforellen. Inaugural-Diss., Tierärztl. Hochschule, Hannover.
29. Fryer, J.L., A. Yusha und K.S. Pilcher. 1965. The in vitro cultivation of tissue and cells of pacific salmon and steelhead trout. Ann. N.Y. Acad. Sci. 126, 566-586.
30. Geologisches Landesamt Baden-Württemberg. 1981. Geologische Karte von Baden-Württemberg, Blatt 4, 1:200000.
31. Ghittino, P. 1965. Viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in rainbow trout in Italy. Ann. N.Y. Acad. Sci. 126, 468-478.
32. Ghittino, P. 1970. Biologische Untersuchungen über die Hämorrhagische Virusseptikämie (HVS). In: Die Hämorrhagische Virusseptikämie (HVS) der Forellen, Münch. Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flußbiologie. Bd. 18. Verlag R. Oldenbourg, München, Wien. S. 29-35.
33. Gocke, D.J. und C. Howe. 1970. Rapid detection of Australia antigen by counter immunoelectrophoresis. J. Immunol. 104, 1031-1032.

34. Gravell, M. und R.G. Malsberger. 1965. A permanent cell-line from the Fathead Minnow (Pimephales promelas). Ann. N.Y. Acad. Sci. 126, 555-565.

35. Gütezustand der Gewässer in Baden-Württemberg. 1981. Gewässerkarte 1:250000, 3. Hrsg.: Ministerium für Ernährung, Landwirtschaft, Umwelt und Forsten, Baden-Württemberg.

36. Hetrik, F.M., J.L. Fryer und M.D. Knittel. 1979. Effect of water temperature on the infection of rainbow trout Salmo gairdneri RICHARDSON with infectious haematopoietic necrosis virus. J. Fish. Dis. 2, 253-257.

37. Heuschmann, O. 1952. Bauchwassersucht bei Regenbogenforellen? Allgem. Fisch. Z. 77, 214-215.

38. Hoffmann, R., C. Pfeil-Putzien, H. Dangschat und M. Vogt. 1979. Untersuchungen zur Pathogenese der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) bei Regenbogenforellen (Salmo gairdneri). II. Hämatologische und histologische Untersuchungen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 180-185.

39. Jensen, M.H. 1963. Preparation of fish tissue cultures for virus research. Bull. Off. int. Epiz. 59, 131-134.

40. Jørgensen, P.E.V. 1971. Egtved virus: demonstration of neutralizing antibodies in serum from artificially infected rainbow trout. J. Fish. Res. Board. Can. 28, 875-877.

41. Jørgensen, P.E.V. 1972. Egtved virus: Antigenic variation in 76 virus isolates examined in neutralisation tests and by means of the fluorescent antibody technique. In: Diseases of Fish. Ed. Mawdesley-Thomas, L.E. Academic Press, London. S. 333.

42. Jørgensen, P.E.V. 1974. Indirect fluorescent antibody techniques for demonstration of trout viruses and corresponding antibody. Acta Vet. Scand. 15, 198-205.

43. Jørgensen, P.E.V. 1980. Egtved virus: The susceptibility of brown trout and rainbow trout to eight virus isolates and the significance of the findings for the VHS control. In: Fish Diseases, Proceedings in Life Sciences. Ed. Ahne, W. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. S. 3-7.

44. Jørgensen, P.E.V. 1982. Egtved virus: Occurrence of inapparent infections with virulent virus in free living rainbow trout, Salmo

gairdneri RICHARDSON, at low temperature. J. Fish. Dis. 5, 251-255.

45. Kaerber, G. 1931. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch. exp. Pathol. Pharmakol. 162, 480-487.
46. de Kinkelin, P. und M. Le Berre. 1977. Isolement d'un rhabdovirus pathogène de la truite fario (Salmo trutta). C.R. Acad. Sc. Paris 284, 101.
47. de Kinkelin, P., J. Bernard und A.M. Hattenberger-Bandoug. 1984. Immunization against viral diseases occurring in cold water. Symposium on Fish-Vaccination, O.I.E. Paris, 20.-22. Febr. 1984.
48. Klee, O. 1985. Angewandte Hydrobiologie. Thieme Verlag Stuttgart, New York.
49. Klingler, K. 1957. Die "Neue Forellenkrankheit". Schweiz. Fisch. Z. 65, 65-66.
50. Kölbl, O. 1978. Infektions- und Immunisierungsversuche mit dem Erreger (Egtved-Virus) der Viralen Hämorrhagischen Septikämie der Regenbogenforellen. In: Diagnose und Behandlung von Fischkrankheiten. DVG, München, 61-76.
51. Konrad, M., J. Rapp und P.-J. Enzmann. 1984: Epidemiological studies on VHS in a wild fish population. Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 4, 69-70.
52. Landesvermessungsamt Baden-Württemberg. 1981. Topographische Karten, Maßstab 1:50 000.
53. Lehmann, J. und F.J. Stürenberg. 1975. Hämatologisch-serologische Substratuntersuchungen an der Regenbogenforelle (Salmo gairdneri RICHARDSON). II. Beschreibung und Darstellung der wichtigsten Zellen in der Blutbildungsstätte und im peripheren Blutgefäßsystem. Gewässer und Abwasser 55/56, 1-123.
54. Lehmann, J. und F.J. Stürenberg. 1980. Techniken zur Blutentnahme bei Süßwasserfischen. Fisch und Umwelt 8. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. S. 77-88.
55. Liebmann, H. 1956. Ernährungsstörung und Degeneration als primäre Ursache der Bauchwassersucht bei Fischen. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 69, 21-25.

56. Liversidge, J., A.L.S. Munro, H.-J. Schlotfeldt und T.P.T. Evelyn. 1985. Fischpathogene Viren. In: Grundlagen der Fischpathologie. Hrsg. Roberts, R.J. und H.-J. Schlotfeldt. Verlag Paul Parey, Berlin, Hamburg. S. 112-173.

57. Lorenz, R.J. 1960. Tabellen zur näherungsweisen Bestimmung von Infektiositäts- und Neutralisationstitern sowie der zugehörigen mittleren Fehler nach dem Verfahren von Kaerber. Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen.

58. Lorenz, R.J. 1964. Dosis-Wirkungs-Kurven als "Trefferkurven". Biometrisches Seminar für Virologen. Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen, 26.-30. Okt. 1964.

59. Maisse, G. und M. Dorson. 1976. Production d'agglutinins anti-Aeromonas salmonicida par la truite arc-en-ciel. Influence de la température, d'un adjuvant et d'un immunodépresseur. Ann. Rech. Vétér. 7, 307-313.

60. Manning, M.J. 1983. Factors affecting the immune response of fish. 1st International Conference of the European Association of Fish Pathologists. Plymouth. 20.-25. Sept. 1983.

61. Mayr, A., P.A. Bachmann, B. Bibrack und G. Wittmann. 1974. Virologische Arbeitsmethoden. Bd. I, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. S. 270-277.

62. Mayr, A., P.A. Bachmann, B. Bibrack und G. Wittmann. 1977. Virologische Arbeitsmethoden. Bd. II, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. S. 535-610.

63. Meier, W. und P.E.V. Jørgensen. 1980. Isolation of VHS-virus from pike fry (Esox lucius) with hemorrhagic symptoms. In: Fish Diseases, Proceedings in Life Sciences. Ed. Ahne, W. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. S. 8-17.

64. Meier, W. und K. Pfister. 1981. Viral hemorrhagic septicemia (VHS) in pike (Esox lucius). Schweiz, Arch. Tierheilk. 123, 37-49.

65. Neukirch, M. 1984a. Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) bei Regenbogenforellen (Salmo gairdneri Rich.). Einfluß von Wassertemperatur und Körpergewicht auf die Mortalität nach experimenteller Infektion über das Wasser. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 97, 329-332.

66. Neukirch, M. 1984. Virale Hämorrhagische Septikämie (VHS) bei Regenbogenforellen. Neuere Erkenntnisse zum Verlauf und zur Virusausscheidung. Fischer und Teichwirt 11, 332-334.

67. Neukirch, M. 1985. Persistent VHS virus in trout after experimental waterborne infection. 2nd International Conference of the European Association of Fish Pathologists. Montpellier. 2.-5. Sept. 1985.

68. Neukirch, M. und B. Glass. 1984. Some aspects of virus shedding by rainbow trout (Salmo gairdneri RICHARDSON) after waterborne infection with viral haemorrhagic (VHS) virus. Zbl. Bakt. Hyg. A 257, 433-438.

69. Nuemann, W. und J. Deufel. 1956. Vorläufige Ergebnisse unserer Untersuchungen über die neue Forellenkrankheit. Allgem. Fisch. Z. 81, 223-224.

70. Olberding, K.P. und J.W. Frost. 1975. Electron microscopical observations of the structure of the virus of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) of rainbow trout (Salmo gairdneri). J. gen. Virol. 27, 305-312.

71. Olesen, N.J. und P.E.V. Jørgensen. 1982. Can and do herons serve as vectors for Egtved virus? Bull. Eur. Ass. Fish. Pathol. 3, 48.

72. Ord, W.M., M. Le Berre und P. de Kinkelin. 1976. Viral hemorrhagic septicemia: Comparative susceptibility of rainbow trout (salmo gairdneri) and Hybrids (s. gairdneri x Oncorhynchus kisutch) to experimental infection. J. Fish. Res. Board Can. 33, 1205-1208.

73. Rasmussen, G.J. 1965. A biological study of the Egtved disease (INuL). Ann. N.Y. acad. Sci. 126, 1, 427-460.

74. Roberts, R.J. und H.-J. Schlotfeldt. 1985. Grundlagen der Fischpathologie. Verlag, Paul Parey, Berlin, Hamburg.

75. Romeis, B. 1968. Mikroskopische Technik. Oldenbourg Verlag, München, Wien, 16. Auflage, S. 174.

76. Schäperclaus, W. 1938. Die Schädigung der deutschen Fischerei durch Fischparasiten und Fischkrankheiten. All. Fischereiztg. 41, 256.

77. Schlotfeldt, H.-J. 1981. Fischkrankheiten in Niedersachsen. November 1978 - November 1980. Stand der seuchenrechtlichen Regelung im Bundesgebiet. Fischer und Teichwirt 32, 48-53.

78. Schmid, B. 1960. Histologische Untersuchungen an der Leber von gesunden und an "Infektiöser Nierenschwellung und Leberdegeneration" erkrankter Forellen. Inaugural-Diss., Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

79. Stroh, R. 1960. Histologische Untersuchungen an der Niere von gesunden und an "Infektiöser Nierenschwellung und Leberdegeneration" erkrankter Forellen. Inaugural-Diss., Tierärztl. Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München.

80. Tack, E. 1957. Beiträge zur Erforschung der Forellenseuche. Der Fischwirt 12, 307-314.

81. Tack, E. 1959. Beiträge zur Erforschung der Forellenseuche. Arch. Fischerw. 10, 20-30.

82. Wizigmann, G., C. Baath und R. Hoffmann. 1980. Isolierung des Virus der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) aus Regenbogenforellen-, Hecht- und Äschenbrut. Zbl. Vet. Med. B 27, 79-81.

83. Wizigmann, G. und R. Hoffmann. 1982. Vergleichende lichtmikroskopische und immunologische Untersuchungen bei der Viralen Hämorrhagischen Septikämie (VHS) der Regenbogenforelle. Zbl. Vet. Med. B 29, 782-788.

84. Wizigmann, G., W. Ahne und H.-J. Schlotfeldt. 1983. Laboratoriumsdiagnose von Virusinfektionen bei Süßwasserfischen unter besonderer Berücksichtigung der viralen hämorrhagischen Septikämie (VHS), der infektiösen Pankreasnekrose (IPN) und der Frühlingsvirämie (SVC), Teil 3. Tierärztl. Umschau 38, 197-200.

85. Wolf, K. und M.C. Quimby. 1962. Established eurythermic line of fish cells in vitro. Science 135, 1065-1066.

86. Yaron, A., Berger, A. 1963. The determination of the molecular weight of poly-L-lysine. Biochim. Biosphys. Acta 69, 397-399.

87. Zwillenberg, L.O., M.H. Jensen, und H.H.L. Zwillenberg. 1965. Electron microscopy of the virus of viral haemorrhagic septicaemia of rainbow trout (Egtved virus). Arch. ges. Virusforsch. 17, 1-19.

88. Zwillenberg, L.O. und H.H.L. Zwillenberg. 1968. Transmission and recurrence problems in viral haemorrhagic septicaemia of rainbow trout. Bull. Off. Int. Epiz. 69, 969-976.

# VIII. ANHANG

## Verwendete Geräte

| | |
|---|---|
| Deckgläser: | Sonderanfertigung, Glasstärke 3, ϕ 14 mm |
| Elektrofisch-Geräte: | - EL65 (7,5 kW) Fa. Grassel, Berchtesgaden<br>- FEG 11500 (1,8 kW) Fa. Korinek, Leutkirch |
| Fischhälteranlagen: | - 2,5 $m^3$ Beckeninhalt, Filterkreislaufsystem: Eigenbau des betriebstechnischen Dienstes der BFAV Tübingen<br>- Fischzuchtanlage System "Webori", Webori-Kunststoffe, Blomberg<br>- Glasaquarien, 300 l Beckeninhalt mit Eheim-Saugfilter 2026 |
| Gamma-Zähler: | Berthold MAG 312 mit Teletype Modell 43 |
| Gelkammer für IE: | Behringwerke, Marburg |
| Gelträger für GIE: | Gelfix für Agarose<br>125x125x0,18 mm<br>245x125x0,18 mm<br>Serva, Heidelberg |
| Homogenisator: | Branson Sonifier Cell Disruptor B15 mit Steuergerät TM2 |
| Kühlbrutschränke mit $CO_2$-Steuerung: | - Assab, Hannover<br>- Heraeus, Hanau |
| Laminar-Flow-Arbeitsbank: | Typ D, 4242 MRF; Ceag Shirp; Reinraumtechnik |
| Linbro-Platte: | Costar 24 well, flat bottom |
| Markierungsmarken für Fische: | Kiemendeckelmarken (Marques barets) |

| | |
|---|---|
| | Fa. Presadom, Brive (Frankreich) |
| Mikroskope Zeiss: | - Invertoskop ID 02 MT (mit Phasenkontrast) |
| | - Fotomikroskop II |
| | - Standard-Mikroskop |
| | - Standard-Mikroskop umgebaut für Epifluoreszenz: Quecksilberhochdrucklampe HBO 50 W Filtersatz Nr. 9 für FITC, Erregerfilter BP 450-490 Farbteiler FT 510 Sperrfilter LP520 |
| Objektive: | Neofluar 6,3/0.20 |
| | 16/0.40 |
| | 25/0.60 |
| | 40/0.75 |
| | Zeiss Fototubus + Kamera M35 |
| Mikrotiterplatte: | Costar 96 well, flat bottom |
| Multikanalpipetierhilfe: | Titertek 8er Kamm (5-50 µl) |
| | 8er Kamm (50-200 µl) |
| | 12er Kamm (5-50 µl) |
| pH-Meter: | E 603 Metrohm, Herisau |
| Pipetierhilfe: | "Pipetus", 2 W; Fa. Hirschmann |
| Refraktometer: | Zeiss |
| Rotoren: | SW27, SW41, Beckman |
| Spannungsgeber: | Power supply Mod. GT 500 WTW, Weilheim |
| | LKB Power supply Typ 3371 D; LKB-Produkter-AB, Stockholm |
| Temperaturschreiber: | Typ 256, Wilh. Lambrecht GmbH, Göttingen |
| Zellkulturflaschen: | - Lux (Miles) |
| | 75 $cm^2$ (250 ml) |
| | - Fa. Greiner |
| | 75 $cm^2$ (250 ml) |

Zentrifugen:
- Beckman L3, 50 UZ
- Minifuge 2; Heraeus, Hanau
- Stock Bj. 1956, max. 3000 UpM

Chemikalien und sonstige Materialien

Agarose, hohe Elektroendosmose: Pharmacia, Freiburg
3-Aminobenzoe-säure-ethyl-ester-methansulfat (MS 222): Merck
Bykomycin: Byk Gulden, Konstanz
Coomassie-Blue: Merck
5,5 Diethylbarbitursäure-Natriumsalz: Merck
Entwickler für Röntgenfilme: Tetanal
Ethylene diamine tetracetic acid x $Na_2$-salt (EDTA): Serva
Fetales Kälberserum: Mykoplasmen getestet: Seromed, Berlin
Fixierer für Röntgenfilme: Tetanal
Fluorescein-Isothiocyanat: Koch-Light Laboratories, Ltd.
Giemsa: Serva
Hepes (N-2'-Hydroxäthylpiperazin-2-äthansulfonsäure): Serva
Natriumazetat: Merck
Natriumchlorid: Merck
Paraplast: Fa. Shandon Labor-Technik GmbH, Frankfurt
Penicillin: Grünenthal GmbH
Poly-L-lysin x HBr ($C_6H_{12}N_2O$): Serva
Röntgenfilme: Kodak X-No-Screen; Kodak Direct Exposure Film
Saccharose: Merck
Sephadex: Pharmacia, Freiburg
Tris (hydroxymethyl-aminomethan): Merck
Triton X-100: Serva

Medien, Puffer, Lösungen

Alsever-Puffer:

| | |
|---|---|
| Glucose | 20,5 g |
| Natriumcitrat | 8,0 g |

| | |
|---|---|
| Zitronensäure | 0,55 g |
| NaCl | 4,2 g |

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

Barbitalpuffer, pH 8,2

| | |
|---|---|
| Barbital-Natrium | 8,92 g |
| (5,5-Diethylbarbitursäure-Natriumsalz) | |
| Natriumazetat x $3H_2O$ | 5,89 g |

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen und mit HCl, konz. auf pH 8,2 einstellen

MEM, Minimal Essential Medium

| | |
|---|---|
| NaCl | 6,4 g |
| KCl | 0,4 g |
| $CaCl_2$ | 0,2 g |
| $MgSO_4$ x $7H_2O$ | 0,2 g |
| $NaH_2PO_4$ x $H_2O$ | 0,2 g |
| Glutamin | 0,92 g |
| Glucose | 4,5 g |
| Eisennitrat | 0,1 g |

mit Aqua bidest. auf 500 ml auffüllen

| | |
|---|---|
| $NaHCO_3$ | 2,75 g |
| Inositol | 3,5 g |
| Vitamine | 4,0 ml (Difco, 1 g in 20 ml Aqua bidest. |
| Aminosäuren | 20,0 ml (Difco Mischung) |
| Phenolrot | 0,016 g |

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen (Rezept Serva Heidelberg)

Phosphat-gepufferte, isotonische Salzlösung (PBS)

| | |
|---|---|
| (Phosphate Buffered Saline) | |
| NaCl | 8,0 g |
| KCl | 0,2 g |
| $CaCl_2$ | 0,1 g |
| $MgCl_2$ x $6H_2O$ | 0,1 g |

| | |
|---|---|
| $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ | 1,12 g |
| $KH_2PO_4$ | 0,2 g |

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen

Plaque-Medium

| | |
|---|---|
| Sephadex G 200 (sterilisiert) | 20,0 g |

mit MEM-Hepes auf 1000 ml auffüllen

Tris-EDTA-NaCl (TEN-Puffer)

| | |
|---|---|
| Tris | 6,075 g |
| EDTA | 0,186 g |
| NaCl | 5,8 g |

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen und mit einnormaler HCl auf pH 7,5 einstellen.

Versen-Trypsin (VT)

| | |
|---|---|
| NaCl | 8,0 g |
| KCl | 0,2 g |
| $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$ | 1,15 g |
| $KH_2PO_4$ | 0,2 g |
| Trypsin | 1,25 g |
| Versen | 1,25 g |

mit Aqua bidest. auf 1000 ml auffüllen.

Färbelösung für Agarose-Gele

| | |
|---|---|
| Coomassie-Blue | 1,65 g |
| Methanol ($CH_3OH$) | 300 ml |
| Eisessig ($CH_3COOH$) | 60 ml |
| Aqua dest. | 300 ml |

Entfärber für Agarose-Gele

| | |
|---|---|
| Methanol ($CH_3OH$) | 450 ml |
| Eisessig ($CH_3COOH$) | 450 ml |
| Aqua dest. | 90 ml |

| Fixierlösung für Zellkulturen | |
|---|---|
| Formalin (33%) | 5,0 ml |
| PBS | 85,5 ml |
| Äthanol | 9,5 ml |

| Färbelösung für Zellkulturen | |
|---|---|
| Giemsa-Lösung | 1,0 ml |
| PSB | 99,0 ml |

| Einbettungsmittel bei der Fluoreszenztechnik | |
|---|---|
| Glycerin | 9,0 ml |
| PBS | 1,0 ml |

Lebenslauf

| | |
|---|---|
| 18. Juni 1955 | geboren in Stuttgart als zweites Kind des Kaufmanns Josef Konrad und seiner Ehefrau Edith, geb. Geckeler |
| 1962 - 1966 | Ludwig-Uhland-Schule (Grundschule) in Leinfelden |
| 1966 - 1976 | Hegel-Gymnasium in Stuttgart-Vaihingen |
| 19. Mai 1976 | Reifeprüfung |
| Oktober 1976 - Februar 1981 | Studium der Fachrichtung Biologie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen |
| 23. Oktober 1978 | Diplom-Vorprüfung an der Universität Tübingen |
| Mai 1981 - September 1982 | Anfertigung einer Diplomarbeit im Fach Zoologie beim Regierungspräsidium Tübingen, Referat 35 |
| 27. November 1981 | Eheschließung mit Martina Köhrer |
| 27. Mai 1982 | Geburt unseres Sohnes Michael Dominik |
| 9. September 1982 | Zeugnis über die Diplomprüfung im Fach Biologie an der Universität Tübingen |

| | |
|---|---|
| seit September 1982 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere, Tübingen. Im Rahmen dieser Tätigkeit Erstellung der vorliegenden Dissertation unter der Anleitung von Prof. Dr. W. Harder und Dr. P.-J. Enzmann. |
| 3. August 1984 | Geburt unseres Sohnes Malte Benjamin |

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, R. Apfelbach, C.F. Bardele, W. Bessler, K. Botzenhart, V. Braun, D. Bunke, K.G. Grell, J. Guglielmi, K. Hantke, W. Harder, O. Klee, G. Mickoleit, F.P. Möhres, H. Netzel, W. Pfeiffer, W. Rähle, A. Rieker, M. Siess, P. Wenk, H. Zähner.